



Impact de traitements antibiotiques sur la flore digestive du porcelet : Etude in vivo et développement d'une approche en système de fermentation in vitro

Mickaël Fleury

► To cite this version:

Mickaël Fleury. Impact de traitements antibiotiques sur la flore digestive du porcelet : Etude in vivo et développement d'une approche en système de fermentation in vitro. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2015. Français. NNT : 2015REN1B002 . tel-01156521

HAL Id: tel-01156521

<https://theses.hal.science/tel-01156521>

Submitted on 27 May 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie Santé

École doctorale Vie–Agro–Santé

présentée par

Mickaël FLEURY

préparée au sein de l'unité de recherche ANSES Ploufragan
et de l'EA CIDAM Clermont-Ferrand

Impact

de traitements antibiotiques

sur la flore digestive

du porcelet :

Etude *in vivo* et développement

d'une approche en système

de fermentation *in vitro*

**Thèse soutenue à Rennes
le 27 février 2015**

devant le jury composé de :

BUTAYE Patrick

Professeur, Laboratoire de pathologie, bactériologie et maladies
avicoles, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Ghent,
Belgique / **Rapporteur**

LACROIX Christophe

Professeur, Laboratoire de biotechnologie alimentaire, ETH,
Zürich, Suisse / **Rapporteur**

BELLOC Catherine

Maître de conférences UMR Oniris-INRA, Ecole vétérinaire,
Nantes, France / **Examinatrice**

BLANQUET-DIOT Stéphanie

Maître de conférences, EA CIDAM, Faculté de Pharmacie,
Université d'Auvergne, France / **Examinatrice**

GUILLOU David

Responsable Nutrition porcine, Schothorst Feed Research,
Lelystad, Pays-Bas / **Examineur**

KEMPF Isabelle

Directeur de recherches, Unité MB, Anses Ploufragan, France /
Directrice de thèse

ALRIC Monique

Professeur, EA CIDAM, Faculté de Pharmacie, Université
d'Auvergne, France / **Co-directrice de thèse**

À mes parents

Liste des publications et communications

Publications et revue

- **Fleury M. A.**, Jouy E. , Eono F. , Cariolet R., Couet W. , Gobin P., Le Goff O., Blanquet-Diot S., Alric M. and Kempf, I. Impact of colistin on piglet gut microbiota (soumis à Veterinary Microbiology)
- **Fleury M. A.** , Mourand G. , Jouy E. , Eono F. , Cariolet R., Guérin A. , Le Goff O., Blanquet-Diot S., Alric M. and Kempf, I. .Impact of ceftiofur injection on the microbiota and the E. coli resistance of pigs. (soumis à Antimicrobial Agents and Chemotherapy)
- **Fleury M. A.**, Le Goff O., Denis, S., Chaucheyras-Durand F., Jouy E., Kempf, I., Blanquet-Diot S and Alric M. Development and validation of a new dynamic *in vitro* model of the piglet colon (PigutIVM) : application to the study of probiotics. (en préparation)
- Kempf I., **Fleury M. A.**, Drider D., Bruneau M., Sanders P., Chauvin C., Madec J. Y., Jouy E. What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe? Int. J. Antimicrob. Agents. 2013; 42 (5) : 379-83. IF2013 : 4,259

Communications orales

- **Fleury M.A.**, E. Jouy, F. Eono, R. Cariolet, S. Blanquet-Diot, M. Alric, I. Kempf. Impact of two colistin dosages on piglet intestinal microbiota. 5th annual Young researchers in Life Science (YRLS) Conference, Mai 2014, Institut Pasteur, Paris, France.
- **Fleury M.A.**, E. Jouy, F. Eono, R. Cariolet, W. Couet, P. Gobin, S. Blanquet-Diot, I. Kempf, M. Alric. Impact d'un traitement antibiotique à la colistine sur le microbiote intestinal du porcelet. 11ème rencontre des microbiologistes clermontois, Avril 2014, Clermont-Ferrand, France.
- Kempf I., **Fleury M. A.**, Jouy E. Résistance à la colistine chez les souches d'E. coli de Porc. Association Française de Médecine Vétérinaire et Porcine, Décembre 2013, Maisons-Alfort, France.
- **Fleury M.A.**, E. Jouy, F. Eono, R. Cariolet, S. Blanquet-Diot, M. Alric, I. Kempf. Impact of two colistin dosages on piglets intestinal microbiota. 5th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE), Juillet 2013, Ghent, Belgium.

Communications affichées

- **Fleury M.A.**, A. Guerin, G. Mourand, E. Jouy, F. Eono, R. Cariolet, S. Blanquet-Diot, M. Alric, I. Kempf. Impact of 3rd generation cephalosporin treatment on pig gut microbiota and subsequent transfer of E. coli resistance 9th Rowett-INRA Symposium 2014, June 2014, Aberdeen, Scotland, UK.
- **Fleury M.A.**, E. Jouy, F. Eono, R. Cariolet, W. Couet, P. Gobin, S. Blanquet-Diot, M. Alric, I. Kempf. Impact d'un traitement antibiotique à la colistine sur le microbiote intestinal du porcelet. Journées des doctorants Anses, Novembre 2013, Paris, France.

Résumé

Dans le contexte de l'antibiorésistance, l'objet de ce doctorat vise à évaluer l'impact d'antibiotiques sur le microbiote intestinal de porcelets. La colistine et le ceftiofur, pour lesquels les résistances incluent essentiellement et respectivement mutations chromosomiques et gènes plasmidiques, ont été utilisés. La colistine a significativement réduit la population des entérobactéries, mais aucun *E. coli* résistant n'a été détecté. L'administration de ceftiofur a eu un impact limité sur les populations bactériennes composant l'écosystème digestif mais a conduit à une forte sélection et à la diffusion d'un gène plasmidique codant pour une bêta-lactamase à spectre étendu.

Puis, dans le cadre de la réglementation visant à diminuer l'expérimentation animale, un modèle *in vitro* colique porcin, nommé PigutIVM, a été mis au point afin de simuler l'environnement digestif du porcelet et a permis de confirmer, *in vitro*, l'effet observé *in vivo* de la colistine sur le microbiote. Cet outil a ensuite été utilisé pour évaluer l'impact d'un probiotique, *Saccharomyces cerevisiae*, comme alternative aux antibiotiques. Le modèle PigutIVM devrait se positionner comme un outil de prédiction pertinent dans les domaines d'investigation aussi bien nutritionnels que pharmacologiques.

Mots clés : Microbiote intestinal, antibiorésistance, PigutIVM modèle, porcelet.

Abstract

In the context of antibiotic resistance, the aim of the current PhD work is to assess the impact of antibiotics on intestinal microbiota of piglets. Two antibiotics *i.e.* colistin and ceftiofur, for which the main resistances include respectively chromosomal mutations and plasmid genes have been used. Colistin significantly reduced the population of *Enterobacteriaceae*, but there was no selection of resistant *E. coli*. The administration of ceftiofur had a limited impact on the bacterial populations that make up the digestive ecosystem but it led to strong selection and dissemination of a plasmid gene encoding an extended-spectrum beta-lactamase. Then, in the framework of regulations to reduce animal testing, an *in vitro* model of colonic pig named PigutIVM was developed in order to simulate the digestive environment of the piglet and then check the effect of colistin on the microbiota simulated in PigutIVM *in vitro*. Therefore both the approaches *i.e.* *in vivo* and *in vitro* were compared in order to check the effect of colistin on intestinal microbiota of piglets. This tool was then used to evaluate the impact of a probiotic *i.e.* *Saccharomyces cerevisiae*, as alternative to antibiotics. Therefore we assume that this PigutIVM model should be positioned as a relevant predictive tool in the fields of nutritional and pharmacological investigations.

Keywords : Intestinal microbiota, antimicrobial resistance, PigutIVM model, piglet.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse : Messieurs Patrick Butaye et Christophe Lacroix, mes rapporteurs ainsi que Madame Catherine Belloc et Monsieur David Guillou mes examinateurs.

Je souhaite aussi remercier tous les partenaires qui ont permis le financement de ce travail à savoir l'Anses, le SIMV, la région Bretagne, le Conseil Général des Côtes-d'Armor et le Conseil Régional Auvergne.

Tout d'abord, je tiens à remercier Isabelle Kempf, ma directrice de thèse, sans qui tout ce travail n'aurait jamais pu voir le jour : Merci pour la qualité de ton encadrement durant ces trois ans ainsi que pour ton grand professionnalisme, ce fut un réel plaisir de travailler en ta compagnie. Merci également pour tes encouragements et ton soutien. Je ne sais pas si c'est le fait que je sois Normand qui t'a encouragé à me recruter, ou encore le fait d'être grand ce qui améliore le rendement d'utilisation de la hotte anaérobie, mais j'espère avoir été à la hauteur de tes attentes tout au long de ces trois années.

Ensuite, je remercie chaleureusement Monique Alric, ma co-directrice de thèse pour tout le soutien que tu as eu l'occasion de m'apporter au cours de cette seconde partie de thèse. En plus de tes qualités d'encadrement, je voudrais souligner tes qualités humaines. En effet, toute l'attention que tu apportes aux détails extérieurs au laboratoire est très appréciable et montre toute l'affection que tu portes aux personnes travaillant auprès de toi.

Je remercie également Stéphanie Blanquet-Diot, alias « chef ». Ce travail se termine mais je suis heureux de pouvoir le continuer et c'est en grande partie grâce à toi et à Monique. C'est un plaisir de travailler en ta compagnie et c'est vrai que la bonne humeur au sein de ce bureau y contribue pour beaucoup. Le simple fait que ton étudiant t'appelle « Mamie » et que tu éclates de rire prouve ton grand sens de l'humour. J'ai également apprécié ce voyage à Aberdeen en ta compagnie et notamment la blague de Mr et Mme Little-Drop à l'ensemble du bus, un grand moment.

Afin d'essayer de n'oublier personne, je vais procéder à des remerciements par laboratoire en commençant par l'Anses de Ploufragan-Plouzané où j'ai débuté ce travail de thèse.

Je voudrais tout d'abord remercier Gilles Salvat, directeur de l'Anses de Ploufragan-Plouzané, pour m'avoir permis de réaliser ce doctorat.

Je tiens ensuite à remercier Eric Jouy pour sa gentillesse et sa grande disponibilité. Merci

pour ces nombreux moments de réflexion scientifique mais aussi pour les conseils amicaux dans certaines situations difficiles. Je ne sais pas si tu en as conscience mais tu m’as énormément aidé sur ce point et cette formation m’a aussi permis de m’intégrer facilement au sein du laboratoire de Clermont. Auprès de toi, j’ai énormément appris au niveau humain et je t’en remercie.

Comment ne pas évoquer ma collègue de bureau qui était au final bien plus que ça : Sandrine Baron. Une fille en or qui a toujours été présente lors de mon périple breton (et l’est encore aujourd’hui). Merci pour ton humour (parfois aussi pourri que le mien, c’est dire). Merci aussi pour tes conseils scientifiques, tes coups de main nocturnes pour la conservation des prélèvements. Merci pour plein d’autres choses mais surtout, merci d’avoir une chienne aussi « atypique », pouvant entraîner la faillite d’un grand nombre de dentistes canins.

Je tiens ensuite à remercier tous les membres de l’UMB à savoir Anne, Corinne, Florence, Gwen, Marie-Pierre, Séverine, Véronique, et une mention spéciale pour Odile et Laetitia que j’ai embêtées jusqu’à la fin de ma thèse avec la préparation et l’envoi d’échantillons pour séquençage aux USA. De même, je remercie également Florent Eono pour ses nombreux coups de main.

Je tiens aussi à remercier l’ensemble de l’équipe HQPAP que j’ai souvent sollicitée pour les cultures anaérobies ou encore l’utilisation des auto-préparateurs.

Merci aussi à tout le personnel du SPPAE et en particulier Frédéric et Roland, pour leur aide concernant la préparation des essais *in vivo* et André (le boucher le plus précis de Bretagne capable de trouver un ganglion avec une lame de 30 cm) avec qui j’ai énormément appris au cours des autopsies. Fred, merci également pour avoir pris le temps de relire ce manuscrit.


Je remercie également le personnel de GVB qui nous a permis de gagner du temps lors des extractions d’ADN en nous laissant utiliser leur robot d’extraction.

Je voudrais également remercier Stéphanie Bougeard pour son aide lors des analyses statistiques ainsi que pour ses petites initiations à l’utilisation du logiciel R. De même, je remercie Claire Chauvin pour toutes ces informations concernant l’utilisation des antibiotiques en élevage. Je remercie aussi le Service Management Qualité ainsi que l’ensemble du personnel administratif que j’ai souvent dérangé lors de mon long déplacement en Auvergne.

Merci au personnel de l’Anses de Fougères et en particulier Agnès Perrin-Guyomard et Manuel Saint-Cyr pour leur accueil au sein de leurs locaux et l’hébergement. Grâce à toi Manu, je n’oublierai jamais ce son : « Les ch’tis à Mykonos!!! ».

Merci à William Couet et Parice Gobin du Service de Toxicologie et Pharmacocinétique du laboratoire du CHU de Poitiers pour l’analyse des résidus de colistine dans les matières fécales. Je suis heureux de voir que la collaboration ayant débuté lors de cette thèse pourra continuer dans le cadre d’autres projets.


Passons maintenant au laboratoire de l’EA-CIDAM de Clermont-Ferrand où j’ai poursuivi ma thèse avec les essais *in vitro*.

Merci (ou plutôt « Trugarez ») à mon jumeau Olivier. C’est vrai qu’à chaque fois que quelqu’un cherche l’un de nous deux, il a le droit au package Olivier-Mickaël (dédicace à , blague de geek). Je ne sais pas trop par quoi commencer tant il y a à dire. Nous sommes

arrivés à quelques semaines d'intervalle à Clermont où nous avons dû nous acclimater en même temps au laboratoire ce qui a probablement contribué à renforcer nos liens. Toujours est-il que tu as toujours été là quand j'avais besoin ou lorsque je faisais des erreurs. Tu m'as dit un jour : « Comme pour la BD, un génie a toujours besoin d'un disciple ! », et bien dans ce cas c'est un régal d'être ton disciple en espérant que l'on puisse continuer notre travail en équipe le plus longtemps possible.

Je ne peux évoquer Olivier sans parler de Sylvain, notre ingénieur plus que polyvalent. C'est bien simple, quand il y a un problème, tu as la solution ! Je ne sais pas si c'est le bureau qui veut ça ? Je voudrais te remercier d'être toujours dans le coin quand j'ai besoin, même les week-ends quand les ordinateurs buggent sans explication. Merci aussi pour toutes les aides concernant les commandes de consommables, mais aussi les budgets que toi et Olivier avaient réussi à me débloquer en fin de thèse.

Je remercie aussi Mme Chalencon, la Ninine clermontoise. Merci pour ta bonne humeur, j'espère pouvoir travailler plus souvent avec toi à l'avenir.

Enfin, « merci au Parisien, qui a préféré rester à Paris, d'avoir permis à l'Auvergnat de ne pas partir d'Auvergne pour qu'un Normand découvre la Bretagne puis l'Auvergne ». Ça c'est pour toi mon Jojo, toi la star de  et des statistiques. Je te remercie pour toutes ces soirées, voire nuits passées au 5^{ème} à bosser tout en rigolant. Je suis heureux de voir que tu t'acclimates bien avec les immunologistes. Ton acclimatation rapide au sein de ton nouveau laboratoire prouve encore une fois tes qualités humaines en dépit de ta grande discrétion. En espérant avoir l'occasion de travailler de nouveau avec toi.

Je ne peux évoquer ces nuits de travail au 5^{ème} étage sans parler de ma Chacha. Je te remercie pour tes encouragements et ta bonne humeur au cours de cette année et demi passée à Clermont. Merci pour ces bons moments pendant nos apéro du 5^{ème} en espérant les remettre rapidement en place à mon retour. J'ai passé d'agréables moments en ta compagnie que ce soit au 5^{ème}, 3^{ème} étage ou encore à Vet-Agro lorsque vous aviez besoin d'un petit coup de main. J'ai d'ailleurs eu l'occasion de faire connaissance avec Pilou, un grand moment. Merci à toi !

Dédicace à l'équipe de Pierre : "Le chercheur est fatigué après une belle thèse. En effet, cette thèse n'était pas du tout banale". Merci à Pierre, Eric et Nico pour les discussions footballistiques. Merci aux filles, à savoir Bérénice, Delphine, Clémence, Réjane avec une mention spéciale pour Céline (Capitaine Ribière) et Cyrielle (Princesse Cycy) : ne vous inquiétez-pas, je reste encore un an et demi et je reviendrai avec des blagues encore plus... (si c'est possible).

Merci à J-F pour nos discussions concernant le microbiote du porc, ainsi qu'à Prem. Et merci à toi Nadia pour ces moments inoubliables à Aberdeen : la vidéo du « tube à poster » et surtout ta façon d'essuyer la table de cuisine...

Merci aussi à notre secrétaire magique, Manon plus connue sous le nom d'« Alice », pour les petites pauses sympathiques, et son voisin de bureau Monsieur Jarrige : « Le service d'étage vous salue ! ».

Je remercie aussi toute l'équipe du rez-de-chaussée pour leur bonne humeur et en particulier Eric et Ghislain, avec lesquels j'ai eu le plus l'occasion de discuter.

Je remercie aussi la personne chargée du nettoyage du laboratoire du 5^{ème} étage de m'avoir réveillé sans sursauts à 5h du mat' pour vider les poubelles du bureau avec ses phrases du style : « Vous ne venez pas d'arriver vu vos yeux ! ». Ok je vais rentrer me coucher. . .

Enfin je tiens à remercier tous les stagiaires qui ont participé à ce travail à savoir Alizée, Alan, Fabrice, Laura et Solenn.

Je voudrais maintenant remercier Madame Frédérique Chaucheyras-Durand ainsi que Monsieur David Guillou de nous avoir aidé à monter le projet de post-doctorat. Toutes ces discussions de préparation de projet ont été très enrichissantes. Je pense réellement que ce futur modèle peut être une grande réussite.

Je voudrais ensuite remercier les membres de mes anciens laboratoires qui m'ont donné envie de continuer dans cette voie à savoir le laboratoire de microbiologie alimentaire de l'Université de Caen (et en particulier Nathalie et Adrien), puis le laboratoire Anses de Dozulé (et plus particulièrement Sandrine et Fabien).

Je ne peux pas ne pas remercier mes amis de fac qui m'ont aussi emmené là où je suis : Adrien, Jérémy et Hugo (les Granvillais et leurs soirées inoubliables), Lise alias « Roger » et Antoine, Zoheir, Pauline, Aurélien, Tony, Jérémy alias « Jean-Jacques », les petits loups de 1^{ère} année au Campus 2, ainsi que tous les autres que je n'ai pas cités. Merci aussi aux amis du FC Basly dont « Jean-Mich » qui prend très souvent des nouvelles : je viendrai au prochain tournoi de Beach-soccer promis !

Petite mention spéciale pour les mecs formant avec moi le trépied magique : Dimitri, mon « Dim », et Benoit dit « Dieu » (pour ne pas citer un autre surnom). Les mecs, je ne vous remercierai jamais assez d'être aussi présents pour moi. Nonobstant le fait que vous ayez des capacités humoristiques aussi réduites que les miennes, vous êtes formidables (c'est bon, c'est placé Dim). Ça fait du bien de savoir qu'on a des amis capables d'autant de choses pour vous aider. Vous êtes formidables et maintenant que la thèse est terminée, on va avoir du temps pour skier et découvrir Clermont-Ferrand ensemble. On a des soirées à rattraper avec toutes celles manquées durant ces trois ans.

Je voulais remercier aussi toute ma famille qui m'a soutenu au cours de ces trois ans. Je la prie de m'excuser pour ces absences lors de réunions de familles ou encore les fêtes de Noël durant trois années consécutives. En effet, Clermont, ce n'est pas la porte à côté ! Je vais essayer d'améliorer les choses à l'avenir et m'arranger pour être là un peu plus souvent auprès de vous.

Je tiens à remercier plus particulièrement mon frère Dan. Après une collocation de 5 ans parfois un peu tendue, notre complicité ne cesse de grandir. Je voulais te dire par ces quelques mots que je t'aime petit frère.

Ensuite, je voudrais remercier mes parents qui ne m'ont jamais laissé tomber pendant mon cursus scolaire assez chaotique. On ne pourra jamais oublier tout ce que vous faites pour nous depuis notre naissance. J'espère avoir la force et la patience d'élever mes enfants aussi bien que vous l'avez fait. Vous êtes exceptionnels à mes yeux. Merci à vous de m'avoir offert des cours particuliers quand j'en avais besoin, de m'avoir compris lorsque mon choix de cursus en 1^{ère} année de fac n'était pas le bon et surtout de nous avoir permis, à Dan et moi, d'étudier dans d'aussi bonnes conditions et donc d'arriver là où nous sommes. Ce diplôme est le vôtre !

Enfin, je voudrais remercier ma future femme, Solène, sans qui je n'aurais jamais pu tenir ce rythme effréné. Merci à toi pour ton amour, ton soutien quotidien et tout ce que tu m'apportes depuis 10 ans maintenant. Les études sont enfin terminées. On va enfin pouvoir vivre ensemble comme on en rêve depuis longtemps. Et dans un peu plus d'un an, tout se concrétisera. Je t'aime.

Table des matières

Résumé / Abstract	ii
Remerciements	iii
Liste des abréviations	xvii
 Introduction	 1
 I Synthèse bibliographique	 5
1 Le porcelet	7
1.1 Elevage et alimentation	7
1.1.1 L'élevage porcin	8
1.1.2 L'alimentation du porcelet	9
1.1.2.1 Alimentation générale	9
1.1.2.1.1 Alimentation du porcelet sous la mère	11
1.1.2.1.2 Alimentation au cours du post-sevrage	11
1.1.2.1.3 Alimentation en période d'engraissement	13
1.1.2.2 Autres compléments alimentaires ajoutés à l'alimentation de base	13
1.1.2.2.1 Généralités	13
1.1.2.2.2 Les probiotiques	14
1.1.2.2.3 Autres compléments alimentaires	17
1.1.2.2.4 Comparaison de différents additifs utilisés comme al- ternative aux antibiotiques en élevage porcin	17
1.2 Système digestif du porc et microbiote intestinal	19
1.2.1 Le système digestif du porc	19
1.2.2 Le microbiote intestinal du porcelet	21
1.2.2.1 Implantation du microbiote	21
1.2.2.2 Composition du microbiote	23
1.2.2.3 Les facteurs influençant le microbiote	28
1.2.2.4 Le microbiote en période de post-sevrage	28
1.2.3 Les différentes méthodes d'étude du microbiote intestinal	28

1.2.3.1	Les méthodes culturelles	29
1.2.3.2	Les méthodes de biologie moléculaire	30
2	Les antibiotiques utilisés en élevage porcin	33
2.1	Antibiotiques, définitions, réglementation	33
2.2	Usage des antibiotiques en production porcine	35
2.3	Focus sur la colistine et mécanismes de résistance	44
2.4	Focus sur les C3G et mécanismes de résistance	51
2.4.1	Les céphalosporines : définition, utilisation chez le porc	51
2.4.2	Résistance aux céphalosporines : mécanismes, prévalence et facteurs de risque	54
3	Les modèles coliques <i>in vitro</i>	59
3.1	Les principaux modèles coliques	60
3.1.1	Les systèmes de fermentation « batch »	60
3.1.2	Les systèmes semi-continus et continus	61
3.1.2.1	Le modèle de « Gibson » (Cambridge, Royaume-Uni)	62
3.1.2.2	Le modèle de « Macfarlane » (Cambridge, Royaume-Uni)	62
3.1.2.3	Le système TIM-2 (Zeist, Pays-Bas)	63
3.1.2.4	Le modèle « Cositec » (Giessen, Allemagne)	63
3.1.2.5	Le système colique « ARCOL » (Clermont-Ferrand, France)	63
3.1.2.6	Le système colique « ECSIM » (Clermont-Ferrand, France)	64
3.1.2.7	Le modèle « Lacroix » (Zurich, Suisse)	66
3.2	Optimisations de certains systèmes intestinaux susceptibles d'être adaptées dans des modèles coliques	67
3.2.0.8	Le « M-SHIME » (Ghent, Belgique)	67
3.2.0.9	Le « HMI » (Ghent, Belgique)	67
3.2.1	Perspectives d'évolution en cours de conception et/ou de validation	68
3.2.2	Avantages	68
3.2.3	Limites	69
II	Partie expérimentale	71
1	Traitement antibiotique à la colistine <i>in vivo</i>	73
1.1	Introduction	73
1.2	Article 1	75
1.3	Discussion / Perspectives	104
2	Traitement antibiotique par C3G <i>in vivo</i>	107
2.1	Introduction	107
2.2	Article 2	111

2.3	Discussion / Perspectives	146
3	Modélisation <i>in vitro</i> de l'environnement digestif du porcelet	149
3.1	Introduction	149
3.2	Article 3	151
3.3	Discussion / Perspectives	174
	 Conclusion générale et perspectives	 179
	 Références bibliographiques	 187

Table des figures

1	Répartition européenne du nombre de tonnes de poids vif de porcs abattus en 2013 (Eurostat, 2013)	8
2	Conditions de vie et alimentation du porcelet de la naissance à l'abattage	11
3	Appareil digestif du porc (d'après Rounds and Herd (2012))	20
4	Les différentes régions de l'estomac du porc (d'après thepigsite.com)	20
5	Succession temporelle des genres bactériens présents dans les fèces de porc au cours des premières semaines de vie (Lallès et al., 2004)	22
6	Répartition des grands phylums bactériens composant le microbiote fécal du porc (Lamendella et al., 2011)	26
7	Genres bactériens majeurs et densité bactérienne présente dans les différents compartiments du tractus digestif du porc (Blachier et al., 2013)	26
8	Principaux genres bactériens présents dans le microbiote intestinal du porc et leur influence sur l'Homme ou l'animal (Lallès et al., 2004)	27
9	Évolution de la part des familles d'antibiotiques dans le poids vif traité des porcs (Anses-ANMV, 2014)	38
10	Taux, en mg, d'agents antimicrobiens vétérinaires vendus en 2007 par kg de biomasse de viande de porc, de volailles et de bovins (d'après Grave et al. (2010))	40
11	Ventes totales d'agents antimicrobiens vétérinaires pour les espèces productrices de denrées alimentaires, en mg/PCU, des années 2010 à 2012, pour 26 pays de l'UE (EMA, 2014)	40
12	Cartographie de l'utilisation d'antibiotiques chez le porc en période de post-sevrage, pour des traitements digestifs, respiratoires ou systémiques (Anses, 2014)	42
13	Cartographie de l'utilisation d'antibiotiques chez le porc en période de post-sevrage, pour des traitements locomoteurs ou dermatologiques (Anses, 2014) . .	43
14	Evolution des proportions annuelles de <i>E. coli</i> présentant une zone d'inhibition de diamètre inférieur à 15 mm vis-à-vis de la colistine (disque 50 µg) (Jarrige et al., 2014)	45
15	Noyau céphème : acide 7-aminocéphalosporanique (7-ACA), (Robert-Dernuet, 1995)	51
16	Formule du Sodium de ceftiofur (Clearsynth, 2014)	51
17	Évolution de l'exposition des porcs au ceftiofur (Anses-ANMV, 2014)	54

18	Évolution des proportions de souches de <i>E. coli</i> non-sensibles au ceftiofur chez les porcs, poules/poulets et dindes (2006-2013)	57
19	Le modèle Macfarlane (Macfarlane et al., 1998)	62
20	Le système TIM-2 (Minekus et al., 1995)	63
21	Le modèle ARCOL et ses différentes sondes et capteurs (Denis S., communication personnelle)	64
22	Le modèle 3S-ECSIM, représentant les 3 fermenteurs reliés en série (Feria-Gervasio et al., 2014)	65
23	Le modèle PolyFermS (Tanner et al., 2014a).	66
24	Le microcosme du M-SHIME (Van den Abbeele et al., 2012).	67
25	Le module HMI (Marzorati et al., 2014).	68
26	Évolution des principales populations bactériennes du microbiote fécal, par qPCR et culture, avant, pendant et après traitement à faible dose	104
27	Disposition des animaux au cours de l'essai	108
28	Dénombrement des <i>E. coli</i> résistants aux C3G et à la rifampicine	110

Liste des tableaux

1	Formule d'un aliment pour porcelet « premier âge »	12
2	Formule d'un aliment pour porcelet « deuxième âge »	13
3	Probiotiques utilisés en élevage de porcs	16
4	Facteurs de croissance utilisés en alimentation animale (Broadway et al., 2014) .	17
5	Efficacité et potentiel de développement d'additifs alimentaires et de stratégies alternatives à l'utilisation d'antibiotiques dans l'aliment en élevage porcin (Pluske, 2013)	18
6	Tableau de composition du microbiote du porc (Stewart, 1997)	24
7	Répartition des ventes de matière active en 2013 entre les différentes espèces (Anses-ANMV, 2014)	37
8	Répartition des ventes en 2013 entre les différentes espèces en tonnes de poids vif traité (Anses-ANMV, 2014)	37
9	Tableau représentant les différentes classes de céphalosporines associées à leur spectre d'action	52
10	Tableau représentant les différentes β -lactamases en fonction de leur support génétique et des espèces les produisant (Poirel et al., 2012)	55

Liste des abréviations

3S-ECSIM	3-Stage Environmental Control System for Intestinal Microbiota
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGCC	Acides Gras à Courte Chaîne
ALEA	Animal Level of Exposure to Antimicrobials
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANMV	Agence Nationale du Médicament Vétérinaire
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARCOL	ARtificial COLon
BLSE	β -Lactamases à Spectre Étendu
C3G	Céphalosporines de 3 ^{ème} Génération
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
DGGE	Denaturant Gradient Gel Electrophoresis
EA CIDAM	Equipe d'Accueil Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament
ECSIM	Environmental Control System for Intestinal Microbiota
EOPS	Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques
ESVAC	European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption
INAPORC	Interprofession NAtionale PORCine
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
Inserm	Institut national de la santé et de la recherche médicale
LC-MS	Chromatographie en phase Liquide - Spectrométrie de Masse
LNR	Laboratoire National de Référence
M-SHIME	Mucosal SHIME

MICALIS	Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé
MMA	Mammite-Métrite-Agalactie
OIE	Office International des Épizooties
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P-ECSIM	Proximal Environmental Control System for Intestinal Microbiota
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLP	Protéines Liant la Pénicilline
PMWS	Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Résapath	Réseau d'épidémio-surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes pour l'animal
SAGAM	Scientific Advisory Group on Antimicrobials of the committee for Medicinal products for veterinary use
SIMV	Syndicat de l'Industrie du Médicament et réactif Vétérinaires
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
TIM-2	TNO gastroIntestinal Model 2
TTGE	Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis
UMB	Unité Mycoplasmologie - Bactériologie

Introduction

En 1928, Alexander Fleming découvre le premier antibiotique et c'est le début de l'ère de l'antibiothérapie : toute une classe de médicaments sont alors développés afin de combattre des infections bactériennes à la fois chez l'Homme et chez les animaux (Gould, 2009).

Puis, dans les années 50, les Etats-Unis, puis l'Europe commencent à utiliser ces antibiotiques comme facteurs de croissance en production animale. Afin d'encadrer cette nouvelle pratique, la Commission Interministérielle et Interprofessionnelle de l'Alimentation Animale, créée en France en 1960, établit une liste de substances pouvant être utilisées pour supplémer certains aliments. Par la suite, au niveau européen, la Directive 70/524/CEE précise les conditions d'utilisation, les espèces destinataires, les doses applicables et les délais de retrait. Dès la fin des années 60, les premières alertes concernant la transmission de bactéries résistantes et de gènes de résistance de l'animal vers l'Homme entraînent une réflexion plus approfondie concernant l'utilisation de ces antibiotiques chez l'animal de rente (Coffman et al., 1999; Sanders et al., 2011). En Europe, des retraits successifs des autorisations précédentes d'antibiotiques comme additifs alimentaires sont enregistrés en 1997 (avoparcine), en 1999 (bacitracine-zinc, spiramycine, virginiamycine, tylosine) et en 2006 (avilamycine, flavophospholipol). A compter de 2006, l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance dans les aliments pour animaux est interdite dans les pays de l'Union Européenne. Cependant, leur administration en tant qu'additifs alimentaires reste en usage sur d'autres continents, et en Europe, les antibiotiques sont encore malheureusement parfois utilisés en invoquant un but préventif afin de traiter des animaux sains susceptibles d'être exposés à un facteur de risque pour une maladie infectieuse, l'administration pouvant être individuelle ou collective. Des modes de traitement comme la métaphylaxie sont préconisés afin de cibler non seulement des animaux malades présents dans un lot, mais aussi des animaux cliniquement sains susceptibles d'être infectés du fait de leur proximité avec les malades. Enfin, une administration à but curatif, qu'elle soit individuelle ou collective, est effectuée lorsque tous les animaux traités présentent les symptômes d'une maladie infectieuse à endiguer. Toutes ces modalités d'usage des antibiotiques favorisent la sélection de bactéries résistantes dans le microbiote digestif (en particulier, mais pas uniquement, lorsque les antibiotiques sont donnés par voie orale). Ces bactéries commensales résistantes sont alors un réservoir de gènes de résistance pour les bactéries pathogènes des animaux, et peuvent diffuser dans l'environnement ou la chaîne alimentaire par le biais de carcasses souillées. Il est donc fondamental d'évaluer les conséquences des traitements antibiotiques prescrits aux animaux d'élevage de façon à limiter le risque de sélection de bactéries résistantes ou multirésistantes à

l'origine d'échecs thérapeutiques en médecine vétérinaire ou chez l'Homme.

En raison de l'importante utilisation d'antibiotiques en élevage porcin pour traiter des maladies respiratoires ou digestives, de nombreuses études sont actuellement en cours afin de trouver d'éventuelles alternatives à l'utilisation de ces médicaments tout en maintenant des performances de croissance optimale. C'est dans ce contexte qu'est né ce projet de thèse ayant comme premier objectif de mieux comprendre l'impact potentiel de traitements antibiotiques sur le microbiote digestif de porcelets. Par ailleurs, les réglementations actuelles visant à réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale justifient le deuxième objectif de cette thèse, à savoir le développement et la validation d'un modèle *in vitro* colique porcin qui permettrait de se libérer des contraintes de l'expérimentation animale pour évaluer, par exemple, l'impact de différents antibiotiques ou alternatives aux antibiotiques.

La première partie de ce travail de thèse a consisté en des essais effectués *in vivo* sur porcelets et s'est déroulée au sein des installations du laboratoire de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) de Ploufragan-Plouzané. L'Anses veille à l'amélioration de la santé et du bien-être des animaux ainsi qu'à la qualité sanitaire des denrées d'origine animale. Le laboratoire, situé sur le Zoopôle des Côtes d'Armor, accueille près de 200 agents regroupant des scientifiques, des techniciens, des animaliers et des agents administratifs. Il est Laboratoire National de Référence (LNR) dans de nombreux domaines et est reconnu pour ses analyses dans l'univers des productions avicoles, cunicoles et porcines. Huit unités de recherche et deux services expérimentaux composent ce centre de recherche et d'analyses. Le service expérimental de production de porcs assainis et d'expérimentation a produit et accueilli les porcelets utilisés lors des différents essais *in vivo* et l'essentiel des analyses a été réalisé au sein de l'Unité Mycoplasmaologie - Bactériologie (UMB) dirigée par Isabelle Kempf et constituée de 12 agents permanents. Cette dernière Unité est LNR associé pour la résistance antimicrobienne et LNR pour les mycoplasmoses aviaires. Ses autres missions consistent à étudier l'antibiorésistance chez les bactéries d'origines aviaire, porcine et piscicole, la pathologie respiratoire du porc sous l'angle bactériologique ainsi que les mycoplasmes des volailles et du porc.

La deuxième partie de ce travail de thèse s'est déroulée dans l'Equipe d'Accueil « Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament » (EA CIDAM, EA 4678), dirigée par Monique Alric et composée d'une quinzaine de membres permanents et d'une quinzaine de doctorants. L'expertise et les connaissances en matière de digestion artificielle de cette équipe ont été sollicitées pour répondre au second objectif de cette thèse à savoir le développement d'un modèle *in vitro* pour l'étude de l'impact de traitements antibiotiques sur le microbiote intestinal de porcs. Depuis une vingtaine d'années, cette équipe a développé un plateau de recherche technologique associant des outils de mastication, de digestion, de fermentation et d'absorption à des méthodologies de formulation et à des technologies de génomique

et post-génomique. Elle dispose de plusieurs systèmes simulant les fermentations gastriques, intestinales ou coliques de l'Homme ou de l'animal monogastrique, et en particulier de deux types de fermenteurs, l'ARCOL (ARTificial COLon) qui simule le côlon humain dans son ensemble et le 3S-ECSIM (3-Stage Environmental Control System for Intestinal Microbiota) qui reproduit les trois parties du côlon où siègent des activités fermentaires différentes. Ce sont ces derniers outils qui ont été adaptés à la fermentation colique du porcelet. Dans le cadre de ses missions scientifiques, en référence à différentes situations physiologiques, l'équipe évalue l'intérêt de stratégies basées sur l'utilisation de souches probiotiques. Dans ce contexte, après avoir étudié l'effet d'un antibiotique sur les populations bactériennes du microbiote du porcelet, nous avons complété l'étude en testant également l'impact d'un probiotique sur ces différentes populations.

Nous distinguerons deux parties dans ce mémoire.

La première présente une synthèse bibliographique décrivant l'élevage porcin et son alimentation, le système digestif du porc et son microbiote intestinal associé, les principaux antibiotiques utilisés en élevage porcin et enfin les modèles de fermentation coliques artificiels existant à ce jour.

La seconde partie décrit, dans un premier temps, les analyses réalisées lors de différents traitements antibiotiques (colistine et ceftiofur) administrés *in vivo* à des porcelets, puis dans un deuxième temps, les travaux effectués pour adapter l'outil *in vitro* à la fermentation colique du porcelet et les résultats, obtenus dans ce système *in vitro*, relatifs à l'étude de l'impact de la colistine, et d'un probiotique, *Saccharomyces boulardii*, sur les différentes populations du microbiote porcin.

Enfin, sont présentées les conclusions ainsi que les différentes perspectives associées à ces travaux de thèse.

Première partie

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Le porcelet

Sommaire

1.1	Elevage et alimentation	7
1.1.1	L'élevage porcin	8
1.1.2	L'alimentation du porcelet	9
1.2	Système digestif du porc et microbiote intestinal	19
1.2.1	Le système digestif du porc	19
1.2.2	Le microbiote intestinal du porcelet	21
1.2.3	Les différentes méthodes d'étude du microbiote intestinal	28

Le porc domestique *Sus scrofa domesticus* est un mammifère monogastrique. Cette espèce est composée de plusieurs races, dont le Large White, originaire d'Angleterre et introduite en France dans les années 1920. Cette race de grands porcs est destinée à la production de viande et de produits de charcuterie. Le marché européen annuel représente 152 millions de porcs, soit 10% du cheptel mondial. Pour l'Union Européenne (figure 1), ceci représente environ 22 millions de tonnes en 2013 dont près de 2 millions de tonnes pour la France, placée 3^{ème} producteur derrière l'Allemagne et l'Espagne (Eurostat, 2013).

La viande de porc étant l'une des viandes les plus consommées dans le monde, des systèmes d'élevage en plein air ou intensifs ont été mis en place pour une plus grande productivité.

1.1 Elevage et alimentation

L'objectif d'un éleveur de porcs français est d'obtenir des animaux atteignant un poids vif d'environ 115 à 120 kg (IFIP, 2014) aux alentours de 26 semaines d'âge, ceci en diminuant au maximum les coûts de production, tout en respectant les normes d'élevage imposées.

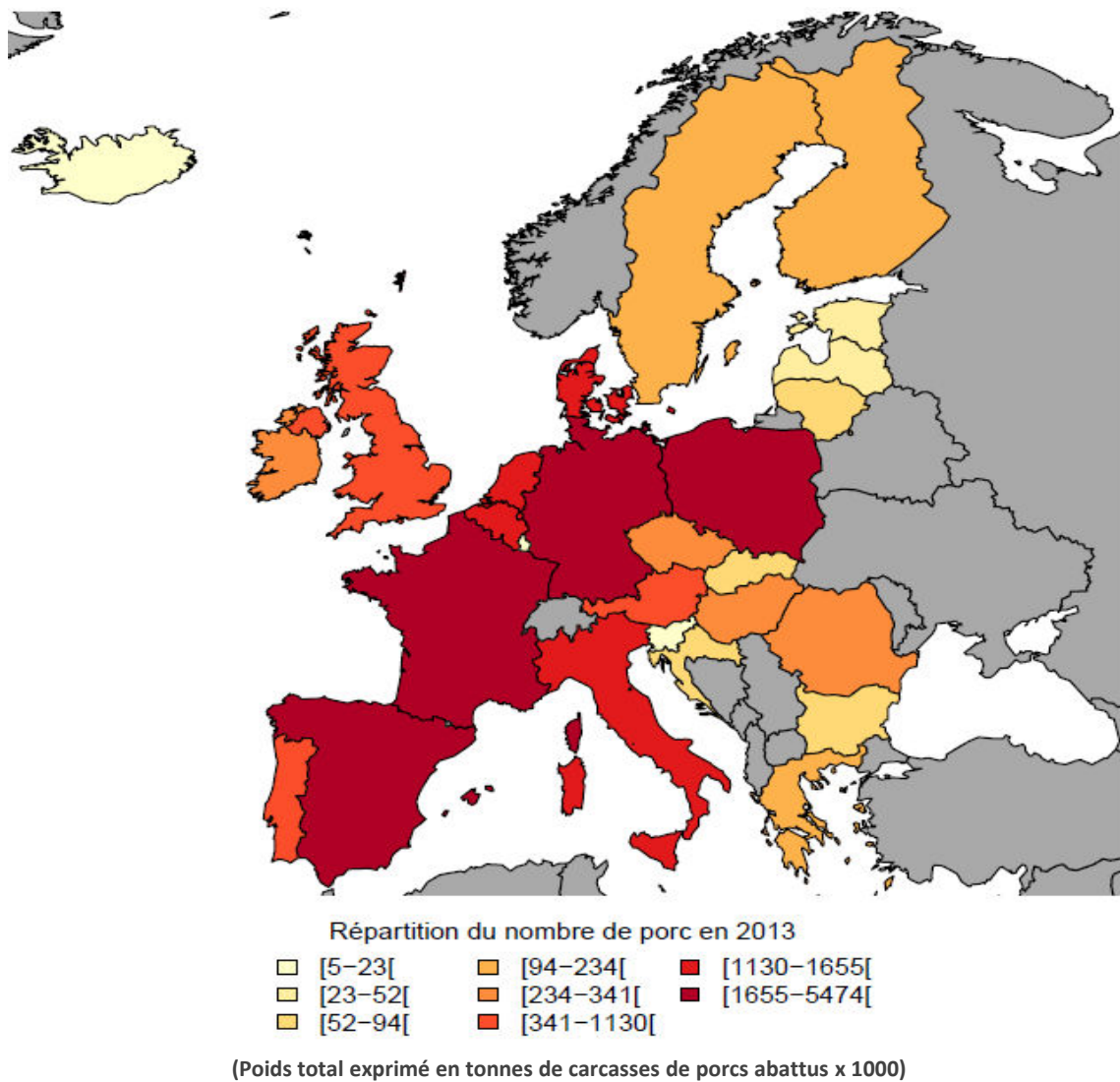


FIGURE 1. Répartition européenne du nombre de tonnes de poids vif de porcs abattus en 2013 (Eurostat, 2013)

1.1.1 L'élevage porcin

En France, la reproduction porcine se fait essentiellement par insémination artificielle (Béraud, 2011), la durée de gestation de la truie étant de trois mois, trois semaines et trois jours. La truie donnera alors naissance à une dizaine de porcelets et pourra avoir un peu plus de deux portées par an (IFIP, 2014). La séparation du porcelet de la mère, plus communément appelé sevrage, se pratique principalement à l'âge de 28 jours, à un poids moyen de 6 à 8 kg (IFIP, 2014). La période suivant cet acte de séparation, appelée post-sevrage, dure un mois. Durant le post-sevrage, l'animal va endurer de multiples stress physiologiques, physiques et psychiques allant du changement de local au changement d'alimentation (passant ainsi d'une alimentation liquide à une alimentation solide). La phase d'engraissement, ou finition, commence au moment où l'animal atteint 25 à 35 kg et se continue jusqu'à atteindre 115 à 120 kg (IFIP, 2014), à un âge d'environ 26 semaines pour le porc. Ce dernier est ensuite envoyé à l'abattoir.

L'élevage porcin industriel présente la particularité d'être conduit « en bandes » (Pellois

et al., 1998; Hebert et al., 2007), c'est-à-dire par lots d'animaux à un même stade physiologique et ceci, afin de répondre spécifiquement à leurs besoins (alimentation, conditions de logement, ...). Ce mode de conduite d'élevage, à partir de la synchronisation des inséminations des truies, permet également une organisation optimale du travail de l'éleveur, une rentabilité meilleure de l'utilisation des bâtiments et un contrôle sanitaire facilité (Ice et al., 1999; De Grau et al., 2005). La conduite en 7 bandes appelée aussi « conduite à trois semaines » est la plus rencontrée en France (adoptée par 86% des élevages naisseurs-engraisseurs selon les données de l'ITP en 2000, Hebert et al. (2007)). D'un point de vue sanitaire, elle permet un vide sanitaire de 7 jours dans tous les postes de l'élevage.

Les conditions de vie des porcelets en élevage sont primordiales afin de limiter l'apparition ou la propagation de maladies bactériennes ou virales. Les paramètres d'ambiance tels que la température, l'hygrométrie, la propreté des surfaces, la quantité de poussières, les teneurs en gaz ou encore la vitesse de l'air sont donc à surveiller (Massabie et al., 1998).

Dans les années 60, les systèmes de production étaient encore mixtes (Ilari et al., 2004) et, avec la recherche d'amélioration de rendements, trois spécialisations distinctes ont vu le jour et peuvent être choisies par les éleveurs :

- le naisseur va se préoccuper de la reproduction des truies et des porcelets de la naissance jusqu'à la période de post-sevrage.
- l'engraisseur sera, lui, en charge des animaux dans les périodes de post-sevrage et engraissement et ce, jusqu'à leur âge d'abattage.
- le naisseur / engraisseur s'occupera des porcs tout au long de leur vie, ce mode de fonctionnement étant le plus répandu en France (IFIP, 2014).

Par l'intermédiaire de cette spécialisation pour une certaine période de vie de l'animal, de meilleurs résultats ont pu être obtenus aussi bien au niveau de la productivité qu'au niveau sanitaire (Corrégé et al., 2011). L'amélioration de ces résultats passe par une recherche perpétuelle de performance dans le but d'augmenter non seulement le prix lors de la vente, le nombre d'animaux produits et leur vitesse de croissance mais aussi de limiter les coûts totaux de production (aliments, médicaments, ...). En plus des critères d'hygiène à respecter pour favoriser la croissance des porcelets, la composition de l'aliment est un paramètre clé à prendre en compte pour une production optimale.

1.1.2 L'alimentation du porcelet

La qualité de l'aliment doit permettre au porcelet de traverser l'étape de sevrage dans les meilleures conditions et d'exprimer son potentiel génétique tout en évitant les pathologies digestives fréquentes à cet âge.

1.1.2.1 Alimentation générale

D'une manière générale, la production de viande porcine nécessite 6 catégories générales de nutriments à savoir de l'eau, des glucides, des lipides, des protéines, des minéraux et des

vitamines (Gadoud, 2004). Chez le porc, l'acide aminé limitant est la lysine, les calculs de ration sont donc établis de manière prioritaire pour cet acide aminé (IFIP, 2013). Ces nutriments vont provenir de matières premières fréquemment utilisées en alimentation animale : céréales, protéagineux, tourteaux, minéraux, acides aminés et vitamines.

Les porcs doivent avoir un accès libre et facile à l'eau à partir de leur phase de post-sevrage et la quantité ingérée varie en fonction de l'âge de l'animal, du type d'alimentation disponible (Seynaeve et al., 1996), de la température de l'animalerie et de la santé de l'animal. La qualité de l'eau est importante sous peine d'apparition de maladies bactériennes (eau contaminée) ou de refus temporaire d'eau pouvant induire des déséquilibres digestifs (Hutschemaekers et al., 1976).

D'un point de vue réglementaire, l'UE a commencé par conditionner les bases de l'alimentation animale en 1982 avec l'établissement de la directive 82/471/CEE autorisant l'utilisation de certains produits, tels que des bactéries, levures ou acides aminés, en alimentation animale. Puis, en 1993, la Communauté Européenne a statué sur l'autorisation de certains ingrédients pour animaux ayant des capacités nutritionnelles particulières (comme, par exemple, la méthionine). Elle a par la suite légiféré concernant les produits autorisés en alimentation animale et plus précisément concernant les conditions de circulation des matières premières entrant dans les aliments pour animaux à travers la directive 96/25/CE, avec notamment la présence d'un étiquetage strict comprenant la composition du produit ainsi que les coordonnées du producteur.

A partir du début des années 2000, les choses se sont accélérées avec en 2001, l'établissement de la directive 2001/18/CE concernant la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés et plus particulièrement leur utilisation en alimentation animale. Puis, pour limiter certains abus, les substances indésirables pouvant être retrouvées dans les aliments pour animaux telles que l'arsenic, le plomb, le mercure ou encore le cadmium, ont été listées dans le cadre de la directive 2002/32/CE. Ensuite, en 2003, la Communauté Européenne a réglementé l'autorisation et l'utilisation des additifs destinés à l'alimentation des animaux (n° 1831/2003). Ce règlement a d'ailleurs permis de définir « les additifs pour l'alimentation animale », à savoir des substances, micro-organismes ou préparations, autres que les matières premières pour aliments des animaux et les prémélanges, délibérément ajoutés aux aliments pour animaux ou à l'eau pour remplir notamment une ou plusieurs des fonctions. Enfin, les exigences en matière d'hygiène des aliments pour animaux ont été précisées dans le règlement n° 1831/2003/CE, à savoir les mesures et conditions nécessaires pour se prémunir contre les dangers et garantir le caractère propre à la consommation animale d'un aliment pour animaux. Par exemple, on peut citer la mise en place, l'application ou le maintien de procédures écrites permanentes fondées sur les principes HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) : c'est la mise en place d'un système qui identifie, évalue et permet la maîtrise des dangers significatifs concernant la sécurité des aliments pour animaux.

Dans cette partie, nous nous focaliserons uniquement sur l'alimentation du porcelet sous la mère jusqu'au début de la période d'engraissement (figure 2), période qui fait l'objet d'étude

de ce doctorat.

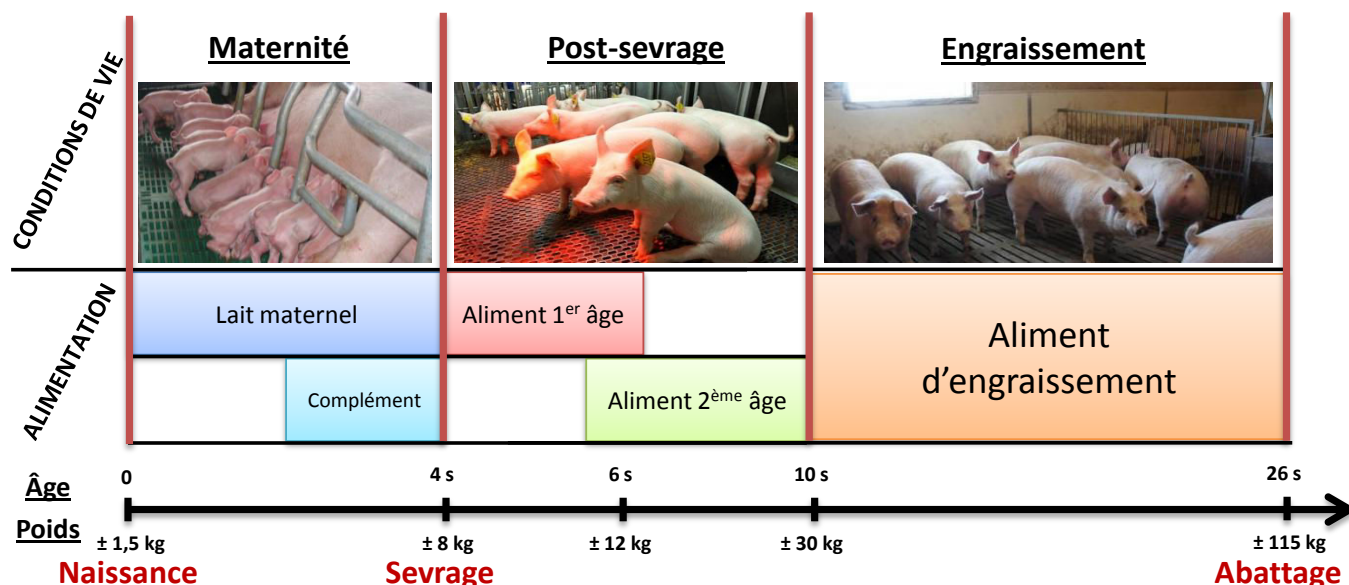


FIGURE 2. Conditions de vie et alimentation du porcelet de la naissance à l'abattage

1.1.2.1.1 Alimentation du porcelet sous la mère

Le porcelet sous la mère se nourrit essentiellement du lait maternel. Le lait de truie est très concentré en protéines, lactose et matières grasses. Le porcelet tète 10 à 20 fois par jour avec une consommation de 10 à 50 grammes de lait par tétée (IFIP, 2013). Néanmoins certains compléments alimentaires peuvent être distribués aux porcelets pour améliorer leurs défenses immunitaires ou pour les préparer au sevrage.

Un premier complément d'allaitement à base de colostrum bovin peut être administré les 2 premiers jours de vie du porcelet. Il vise à aider l'animal à disposer d'un meilleur arsenal de défenses à la naissance. Cependant, ce dernier ne peut remplacer totalement le lait maternel de la truie, qui est composé d'un équipement enzymatique permettant la digestion des lipides, des protéines et du lactose présent dans le lait maternel (IFIP, 2013).

A partir de 10 jours après la naissance, un complément d'allaitement peut être donné aux animaux en parallèle du lait maternel. Cette phase, plus connue sous le nom de « creep feeding », est courte mais reste capitale pour les bons résultats d'un élevage (Fraser et al., 1994). Ce complément de transition, qui doit combiner appétence et digestibilité, peut être donné sous forme de farine ou granulés. Il a pour but d'aider l'animal à digérer le plus tôt possible des matières végétales (Hampson and Kidder, 1986) en permettant une adaptation de la fonction digestive du porcelet plus rapide, et d'obtenir ensuite un sevrage moins brutal. De plus, cela conduit à des poids d'animaux plus homogènes au moment du sevrage.

1.1.2.1.2 Alimentation au cours du post-sevrage

Physiologiquement, les porcelets sont sevrés progressivement vers l'âge de huit semaines, mais en élevage industriel, le sevrage s'effectue le plus souvent vers quatre semaines (Gadoud, 2004), et reste brutal même s'il est préparé. En pratique, le sevrage consiste à séparer les petits de leur mère et donc à regrouper des animaux de poids similaires provenant de différentes portées. Cette opération constitue un stress pour l'animal en raison du changement de statut social, avec la perte du lien maternel, et du changement alimentaire, avec un passage d'une alimentation lactée à une alimentation solide. Sous alimentation lactée, le porcelet dispose essentiellement de pepsines gastriques et de lactase pour digérer alors que sous alimentation solide, le porcelet doit synthétiser de nombreuses autres enzymes (lipase, amylase, peptidase) indispensables à la digestion (Huguet et al., 2006).

Un aliment dit 1^{er} âge est alors proposé entre 4 et 6 semaines d'âge. Un exemple de composition d'aliment 1^{er} âge est donné dans le tableau 1.

TABLEAU 1. Formule d'un aliment pour porcelet « premier âge »

Composition	En pourcentage
Produits laitiers	25,4
Céréales cuites	18,0
Orge	18,0
Soja	17,0
Biscuits	5,0
Sucre	5,0
Pomme de terre	3,3
Remoulage de blé	2,6
Huiles végétales	1,4
Minéraux, vitamines	1,2
Arômes, enzymes	
Acides aminés	1,0
Autres	2,1

L'objectif de cet aliment relativement coûteux est d'aider à la mise en place de l'équipement enzymatique définitif du porcelet (IFIP, 2013). L'aliment est généralement présenté sous forme de microgranulés mais il peut être humidifié pour favoriser sa consommation. Malgré l'appétence de cet aliment, la majeure partie des animaux passent par une phase d'anorexie, entraînant ainsi l'apparition d'inflammations au niveau de l'intestin grêle (McCracken et al., 1999). Pour pallier cette faible ingestion liée au stress, l'aliment doit présenter une forte teneur en énergie afin que le porcelet ne puise pas trop dans ses réserves (IFIP, 2013). L'aliment est composé de poudre de lait ou de poudre de lactosérum (moins chère) et il est riche en matières grasses animales ou végétales (Mahan et al., 1998). Pour compléter l'apport énergétique, des céréales peuvent aussi être incorporées en l'état ou après traitement (extrusion, floconnage) afin d'améliorer la disponibilité de l'amidon (IFIP, 2013). Des protéines peuvent être apportées par différentes sources : tourteau de soja, farines de poisson ou encore protéines de pommes de terre... (IFIP, 2013).

Une transition de 4 à 5 jours est ensuite nécessaire afin de passer à un aliment 2^e âge, dont

un exemple de composition est donnée dans le tableau 2.

TABLEAU 2. Formule d'un aliment pour porcelet « deuxième âge »

Composition	En pourcentage
Blé	31,0
Orge	30,0
Soja	22,8
Pois	5,0
Minéraux, vitamines	4,7
Enzymes	
Sons de blé	3,0
Mélasse de canne à sucre	1,0
Tournesol	1,0
Huiles végétales	0,8
Acides aminés	0,7

Cet aliment 2^{ème} âge est distribué aux animaux lorsqu'ils atteignent 12 kg et jusqu'à un poids de 25-30 kg (Institut National Recherche Agronomique, 1989). A ce stade, le porcelet est capable de valoriser des aliments de teneur énergétique variable. Le choix de l'alimentation est donc moins contraignant et le porcelet régulera sa consommation en fonction de la valeur énergétique de l'aliment (IFIP, 2013).

1.1.2.1.3 Alimentation en période d'engraissement

Enfin, un dernier aliment dit d'engraissement est proposé aux animaux âgés à partir de 10 semaines afin de les amener jusqu'à un poids d'abattage situé en moyenne à 115 kg de poids vif. Cet aliment de finition ne sera pas détaillé du fait de son éloignement par rapport à notre sujet d'étude.

1.1.2.2 Autres compléments alimentaires ajoutés à l'alimentation de base

Pour obtenir un aliment le plus compétitif possible et entraînant une croissance optimale, d'autres compléments alimentaires peuvent être additionnés à la ration. Ces derniers sont constitués de minéraux, de vitamines, d'huiles essentielles ou encore de microorganismes vivants.

1.1.2.2.1 Généralités

Les différents additifs utilisés en alimentation animale vont permettre d'améliorer les caractéristiques de l'aliment. Ils doivent recevoir un avis favorable de l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), qui évalue la sécurité sanitaire du produit, son efficacité ainsi que les éventuels effets indésirables sur l'animal et son environnement, leur influence favorable dans l'alimentation sans effet néfaste sur la santé animale, avant d'obtenir une autorisation pour leur mise sur le marché et leur utilisation. Le règlement n° 1831/2003 sert de document

initial à l'autorisation de mise sur le marché et analysera chaque demande sous une déclinaison précise d'additif :

- antiparasitaire, comme les coccidiostatiques et histomonostatiques par exemple.
- nutritionnel à savoir les aminoacides, oligo-éléments ou vitamines par exemple.
- sensoriel comme les arômes ou les colorants par exemple.
- technologique, aussi appelé agent de texture, et plus précisément les antioxydants, conservateurs, émulsifiants ou encore les stabilisateurs.
- zootechnique et plus particulièrement les stabilisateurs de flore intestinale et les améliorateurs de digestibilité.

Ces principaux additifs sont destinés à prévenir les déficits nutritionnels en période de stress (passages viraux, transitions alimentaires, transferts d'animaux, vaccinations), à préparer les animaux à la reproduction, à stimuler l'appétit ou encore à augmenter les défenses immunitaires.

1.1.2.2 Les probiotiques

Seuls les probiotiques, appartenant à la famille des additifs alimentaires zootechniques, sont détaillés dans ce rapport car ils ont fait l'objet de la dernière partie expérimentale de ces travaux de doctorat. Ce sont des microorganismes vivants (bactéries ou levures) qui, ingérés en quantité suffisante, ont un effet bénéfique sur la santé en améliorant l'équilibre de la flore intestinale (FAO/WHO, 2001). Leur utilisation doit être en adéquation avec le règlement CE n°1831/2003 relatif aux additifs destinés à l'alimentation animale.

Les probiotiques peuvent être administrés de trois manières différentes, en tant que microorganismes seuls, sous forme d'un cocktail composé de plusieurs microorganismes (Mori et al., 2011) ou encore incorporés dans l'aliment. Ils peuvent provenir, ou non, de l'espèce animale qui est ciblée pour leur utilisation (Martín et al., 2009), l'objectif en prenant un probiotique originaire de la même espèce animale étant de permettre une meilleure implantation. De nombreuses études portant sur le rôle des probiotiques chez le porc (Bomba et al., 2002; Konstantinov et al., 2008; Bird et al., 2009; Lessard et al., 2009), ont montré que différents paramètres entrent en ligne de compte pour valider ou non la capacité probiotique d'un microorganisme et donc son efficacité. Les principaux critères à prendre en considération sont, outre le genre et l'espèce, la souche, la dose et la durée de traitement (Kenny et al., 2011). De même, il faut toujours s'assurer de la viabilité de la souche administrée, cette dernière conditionnant la formulation, solide ou liquide (Boesen et al., 2004), et donc le mode d'administration. L'environnement de l'animal et son propre microbiote digestif peuvent également avoir un effet synergique ou, au contraire, antagoniste vis-à-vis du probiotique administré (Kenny et al., 2011). Ces différents paramètres représentent les différentes limites à l'utilisation d'additifs alimentaires de type probiotique chez le porc (Bosi and Trevisi, 2010).

En 1989, Fuller a posé les bases de l'utilisation des probiotiques à la fois chez l'Homme et l'animal. Il a proposé différentes hypothèses relatives à leurs modes d'action et décrit leurs principaux bénéfices. En 1994, Ducluzeau et Raibaud ont, par la suite, présenté les différents

probiotiques utilisables chez le porc et précisé leurs mécanismes d'action. Certains probiotiques ont été sélectionnés pour lutter contre différents troubles gastro-intestinaux aussi bien chez l'Homme que chez l'animal (Lalles et al., 2007; Marchesi and Shanahan, 2007; Collado et al., 2009). Ils sont principalement représentés par des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* (Riboulet-Bisson et al., 2012; Konstantinov et al., 2008) et *Bifidobacterium* (Bird et al., 2009). Cependant, d'autres souches comme certains *Bacillus subtilis* ou *Bacillus cereus* (Lodemann et al., 2008), ou encore la souche *Escherichia coli* Nissle 1917 (Šmajš et al., 2012) ainsi que certaines levures du genre *Saccharomyces* (Lessard et al., 2009) sont aussi utilisées comme probiotiques. Les probiotiques seraient capables d'effectuer une décolonisation sélective du tube digestif, d'éviter la prolifération de bactéries pathogènes (Roselli et al., 2007), de neutraliser des entérotoxines produites au niveau du tractus digestif, de moduler l'activité de certaines enzymes bactériennes, ou encore d'exercer des effets positifs sur le système immunitaire (O'Hara et al., 2006; Walsh et al., 2008), voire d'améliorer les capacités digestives de l'intestin grêle.

Les probiotiques ont donc été proposés comme alternative aux antibiotiques puisqu'ils stabilisent les différentes populations du microbiote intestinal et limitent l'implantation de bactéries pathogènes opportunistes. Aussi, suite à la limitation de l'utilisation des antibiotiques dans les élevages, de nombreuses études évaluant l'intérêt des probiotiques ont été menées (en particulier chez le porc en période de post-sevrage). Deux modes d'utilisation sont possibles : (i) le traitement préventif de la truie (Starke et al., 2013) entraînant une réduction des bactéries pathogènes dans son microbiote intestinal et, de ce fait, une réduction de la transmission de bactéries pathogènes de la mère au porcelet et une dissémination moindre dans l'environnement et (ii) le traitement spécifique des porcelets sous la mère, en particulier en prévention lors des périodes de vie critiques de l'animal (post-sevrage, ...). Par exemple, Pieper et al. (2009b) proposent l'utilisation de *Lactobacillus plantarum* chez le porc en période de post-sevrage. Une étude récente montre l'utilisation de *Megasphaera elsdenii* visant à retarder la colonisation de bactéries résistantes aux antibiotiques chez le porc (Stanton and Humphrey, 2011) et plus récemment d'autres études concernant l'utilisation de probiotiques chez le porc (Bosi and Trevisi, 2010; Riboulet-Bisson et al., 2012; Saraoui et al., 2013; Starke et al., 2013; Upadrasta et al., 2013; Valdovska et al., 2013; Liu et al., 2014; Sattler et al., 2014) démontrent l'intérêt de leur utilisation en élevage porcin comme le montre le tableau 3.

TABLEAU 3. Probiotiques utilisés en élevage de porcs

Probiotiques utilisés	Effets sur l'animal ou sur son microbiote intestinal	Références
<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415 <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Lactobacillus paraplantarum</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<p>Revue détaillant les effets de différentes souches de probiotiques. Ces effets peuvent être multiples : potentiel antimicrobien, action sur l'arsenal immunitaire, aide à l'adaptation lors de périodes de vie critique (post-sevrage), stabilisation du microbiote,...</p>	Bosi and Trevisi, 2010
Bactériocine Abp118 produite par <i>Lactobacillus salivarius</i>	Diminution des <i>Spirochaetes</i> et des <i>Firmicutes</i> Effet bactériocine dépendant	Riboulet-Bisson et al., 2012
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Adaptation de ce probiotique validée par la survie de cette bactérie dans le côlon après 24h et la présence d'une activité métabolique	Saraoui et al., 2013
<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	Augmentation du nombre de <i>Lactobacillus</i> dans les matières fécales des truies Augmentation des <i>Lactobacillus</i> transmise aux porcelets Diminution de l'effet de ce probiotique (donné aux truies) chez les porcelets après le post-sevrage	Starke et al., 2013
Aliment supplémenté avec une levure de cidre comparaison entre animaux témoin et ceux traités	Effet de cette supplémentation en levure sur le microbiote des porcelets Diminution des genres <i>Salmonella</i> et <i>Escherichia</i> Augmentation du genre <i>Prevotella</i>	Upadrasta et al., 2013
Topinambour associé aux <i>Lactobacillus reuteri</i> et <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Effet de cette association sur le microbiote ainsi que sur l'arsenal immunitaire de l'animal Diminution des <i>Enterobacteriaceae</i> et coliformes Augmentation des <i>Lactobacillus</i>	Valdovska et al., 2013
<i>Lactobacillus fermentum</i> 15007	Effet du probiotique sur les concentrations d'acides gras à courte chaîne (AGCC) et sur les communautés microbiennes du côlon Réduction du nombre de <i>Clostridium</i>	Liu et al., 2014
Inuline	Augmentation du nombre de <i>Bifidobacterium</i> dans l'iléon Augmentation de la diversité microbienne dans le côlon Diminution du nombre d' <i>Escherichia</i>	Sattler et al., 2014

1.1.2.2.3 Autres compléments alimentaires

Du fait de leur éloignement par rapport à notre sujet d'étude, nous ne détaillerons pas les autres compléments alimentaires supposés permettre la réduction de la consommation d'antibiotiques en élevages mais ils sont listés dans le tableau 4.

TABLEAU 4. Alternatives aux antibiotiques, utilisés comme facteurs de croissance, pouvant être utilisées en alimentation animale afin de promouvoir la santé globale des animaux et/ou influencer la colonisation ou l'exclusion d'un pathogène (Broadway et al., 2014)

DFM ¹	Bactériophage	Composés Phytochimiques	Acide
<i>Bacillus</i>		Citrulline	Acétique
<i>Lactobacillus</i>		Pulpe de citron	Caproïque
<i>Lactococcus</i>		Curcumine	Formique
<i>Streptococcus</i>		Eugénol	Fumarique
<i>Yeast</i>		Flavonoïdes	Malique
Yeast cell wall		Limonène	Propionique
		Chlorate de sodium	
		Linalol	
		Pipérine	
		Thymol	

¹ Direct Fed Microbials : Probiotiques

Il est cependant important de noter qu'un grand nombre de stratégies alternatives aux antibiotiques sont en cours de développement, les recherches se basant essentiellement sur la validation de leur pouvoir antibactérien connu ou supposé. Certains produits, chimiques, comme par exemple l'oxyde de zinc (Broom et al., 2006), sont aussi utilisés à dose élevée (environ 2500 ppm de ZnO sous forme d'aliment médicamenteux) pour leurs effets sur les *E. coli* entéropathogènes. Cette utilisation n'est actuellement pas autorisée en France (Anses, 2012).

1.1.2.2.4 Comparaison de différents additifs utilisés comme alternative aux antibiotiques en élevage porcin

Une comparaison des différents additifs alimentaires et de leurs effets respectifs est représentée dans le tableau 5.

TABEAU 5. Efficacité et potentiel de développement d'additifs alimentaires et de stratégies alternatives à l'utilisation d'antibiotiques dans l'aliment en élevage porcin (Pluske, 2013)

Stratégies	Composés	Efficacité ¹	Potentiel de développement ¹
Additif alimentaire	Antibiotiques	+ + + + + +	0
	Oxyde de zinc	+ + + + +	0
	Sulfate de cuivre	+ + + +	0
	Acides organiques	+	0
	Enzymes	+ + + +	+ + +
	Pré-fermentation et inoculation	?	+
	Probiotiques	+	+
	Prébiotiques	+ + + +	+ + +
	Lactose	+ + +	0
	Zéolithes et minéraux argileux	?	0
	Nutraceutiques (gingseng)	?	0
	Soja	+	+
	Immunoglobulines	+ +	?
	Facteurs de croissance épidermique	?	?
	Facteurs de croissance issus du colostrum	?	?
Agriculture / Formation technique	Ensemble de la production	+ + + + +	+ + + + +
	Hygiène	+ + + + +	+ + + +
	Sevrage plus tard	?	0
	Production en extérieure	+	0
	Qualité et administration du colostrum	+ +	+ +
	Immunisation	+ + + +	+ +
	Eau de qualité à disposition	+ +	+ + +
	Formation des éleveurs	+ + + + +	+ + + + +

¹ Score de l'efficacité et du développement défini de manière subjective (0 à + + + + + très fort)
? Effet inconnu

Le tableau 5 montre l'efficacité et le potentiel de développement de différents composés utilisés comme alternatives aux antibiotiques. Certains additifs alimentaires, comme par exemple les enzymes ou les prébiotiques, ont un effet antimicrobien et surtout un grand potentiel de développement.

Notons aussi qu'une application renforcée de certaines pratiques d'hygiène ou encore une meilleure formation des éleveurs pourraient permettre la limitation de la dissémination de certains pathogènes et donc une baisse de l'utilisation des antibiotiques en élevage.

1.2 Système digestif du porc et microbiote intestinal

L'aliment distribué sert de substrat au microbiote gastro-intestinal qui est considéré comme un écosystème complexe et dynamique ayant une influence particulièrement importante sur la santé de l'hôte. L'aliment composé principalement de végétaux, est digéré dans les différents compartiments du tractus digestif du porc. L'anatomie du système gastro-intestinal de ce monogastrique va donc être brièvement exposée avant de présenter plus précisément l'objet de notre étude : le microbiote intestinal.

1.2.1 Le système digestif du porc

La digestion consiste en une transformation de substances nutritives de masse moléculaire élevée en composants élémentaires assimilables par l'organisme appelés nutriments (Wehner and Gehring, 1999). Cette digestion est à la fois mécanique et chimique, et elle fait intervenir de nombreuses enzymes spécifiques présentes dans les différents compartiments du tractus digestif. Puis, l'absorption se définit par le transfert, du segment intestinal vers le flux sanguin, des produits issus de la digestion (Wehner and Gehring, 1999) ou nutriments (acides aminés, di- ou tri-peptides, ...) à travers l'épithélium intestinal avant distribution aux organes.

Afin de mieux comprendre les différentes phases de digestion et d'absorption du système digestif du porc, il faut d'abord s'intéresser aux organes successifs composant ce système, dont les principaux sont représentés sur la figure 3.

Le système digestif débute par la bouche avec une première action de digestion effectuée par la salive sécrétée par trois glandes salivaires. Cette première phase de digestion est due à la présence d'enzymes (dont l'amylase) dans la salive porcine (Hudman et al., 1957).

L'aliment pré-digéré transite ensuite par l'œsophage pour atteindre l'estomac. Ce dernier est composé de quatre parties représentées sur la figure 4. La première dite œsophagienne est une simple extension de l'œsophage. La seconde appelée cardiaque représente près du tiers de l'estomac. Puis, le fundus, ou région gastrique (troisième partie de l'estomac), est placé entre la région cardiaque et la région pylorique (quatrième partie de l'estomac). Cette dernière se termine par un rétrécissement au niveau du sphincter pylorique pour permettre au contenu gastrique de rejoindre le duodénum.

Le microbiote de l'estomac est relativement peu abondant, en raison principalement du pH très acide (inférieur à 3) de l'estomac (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2007; Blachier et al.,

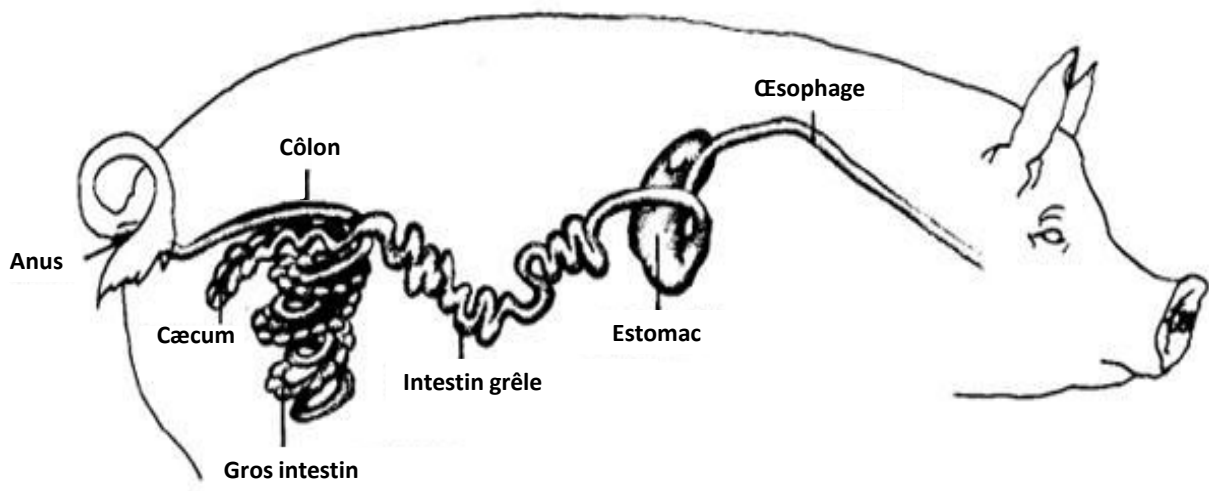


FIGURE 3. Appareil digestif du porc (d'après Rounds and Herd (2012))

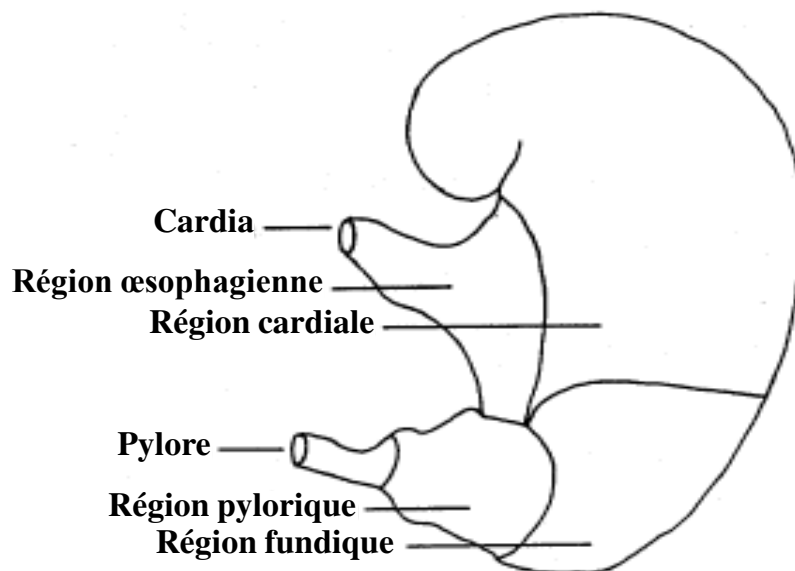


FIGURE 4. Les différentes régions de l'estomac du porc (d'après thepigsite.com)

2013). De ce fait, la digestion est le fait exclusif de cellules ou de glandes spécifiques produisant du mucus et des enzymes telles que la lipase gastrique, la pepsine ou la trypsine (Hedemann and Jensen, 2004).

La digestion est complétée par deux organes annexes au transit digestif (le foie et le pancréas) qui produisent aussi des enzymes se déversant dans le duodénum à la sortie d'aliments pré-digérés.

L'intestin grêle est composé, comme chez l'Homme, de trois parties relativement distinctes que sont le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Il est le lieu principal de la digestion des carbohydrates, lipides et protéines. Ces segments sont recouverts de cryptes et de villosités qui varient en taille et en composition tout au long de ces compartiments. Ces zones permettent des échanges continus entre la lumière de l'intestin et la circulation sanguine. Le temps de transit dans l'intestin grêle dure entre 2 et 6 h chez le porc adulte. Le pH varie entre 6 et 8,5. Le nombre

de bactéries fluctue entre 10^4 et 10^5 bactéries/gramme de contenu, en début d'intestin, et entre 10^7 et 10^9 bactéries/gramme au niveau de l'iléon (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2007). Il y a en effet peu de bactéries dans l'intestin grêle, sauf dans certains cas pathologiques, ceci pouvant être expliqué par une vitesse de transit du bol alimentaire relativement élevée (Ducluzeau and Raibaud, 1994). En période de sevrage, le tractus intestinal se développe induisant une réduction de la production d'enzymes dans l'intestin grêle, provoquant ainsi une diminution de la digestion et des capacités d'absorption (Pluske, 2001).

La valvule iléo-cæcale est la transition entre l'intestin grêle et le gros intestin. Ce dernier débute par le cæcum relativement court (30-40cm) comparativement au côlon qui est, lui, beaucoup plus long et composé de trois parties : les côlons dits « ascendant » (3-5m, enroulé en spirale), « transverse » (court, mal délimité) et « descendant ». Le gros intestin est le site d'absorption des fluides, de la vitamine K, de la biotine et des électrolytes minéraux, mais il est surtout le siège de la digestion des résidus par un microbiote beaucoup plus riche que dans les parties antérieures du tractus. Cette digestion bactérienne entraîne la production d'acides gras à courte chaîne (AGCC) par la microflore (Den Besten et al., 2013), dépendante de l'âge de l'animal et de la composition de l'aliment, permettant ainsi la croissance et la prolifération des cellules épithéliales du côlon. Le temps de transit dans le gros intestin, déjà étudié en modèle porcin (Davis et al., 2001; Ueda et al., 2006), varie entre 24 et 48h chez le porc (Saraoui et al., 2013).

Des phénomènes d'anorexie en période de post-sevrage peuvent conduire à des inflammations de l'intestin (McCracken et al., 1999) et à des changements de la composition du microbiote intestinal (Castillo et al., 2007). Ce microbiote intestinal porcin est présenté dans la partie suivante.

1.2.2 Le microbiote intestinal du porcelet

Le microbiote évolue quantitativement et qualitativement tout au long du tractus. Les nombres de microorganismes les plus élevés sont obtenus dans le cæcum et le côlon. De plus, la composition de cet écosystème est différente selon que l'on se situe dans la lumière intestinale, les cryptes ou au niveau du mucus (Zoetendal et al., 2002; Eckburg et al., 2005). Le microbiote intestinal s'implante rapidement après la naissance et évolue tout le long de la vie du porc en fonction de l'alimentation, de l'environnement et des éventuelles infections de l'animal.

1.2.2.1 Implantation du microbiote

L'établissement du microbiote intestinal du porcelet est un processus complexe qui résulte d'une colonisation initiale débutant à la naissance. En effet, le porcelet naît stérile (Swords et al., 1993), même si des études montrent la possible présence de microorganismes dans le placenta humain (DiGiulio et al., 2008; Aagaard et al., 2014). L'animal est ensuite, dès le début de sa vie, au contact d'une quantité importante de micro-organismes. Ces derniers, provenant des fèces (Sansom and Gleed, 1981), de la peau ou encore du vagin de la truie, envahissent rapidement

le tractus digestif (Conway, 1997) et le colonisent. Afin de pallier au manque d'implantation naturelle du microbiote à la naissance lors de césariennes, Jansman et al. (2012) ont étudié et prouvé les effets bénéfiques d'une colonisation post-natale sur l'établissement du microbiote intestinal du porcelet.

Certaines recherches révèlent comment l'alimentation (et notamment le colostrum) influe sur la structure et les caractéristiques fonctionnelles de l'intestin au cours des 24 premières heures de vie du porcelet (Zhang et al., 1997) et plus précisément dans les 6 premières heures après la naissance (Zhang et al., 1998). En effet, un environnement propice ainsi que des niches écologiques spécifiques sont nécessaires à la multiplication et la survie de cet écosystème. Dans certains cas, les microvillosités mais aussi le mucus (Walker, 1985) peuvent jouer un rôle dans l'attachement des bactéries à certaines parties du tractus afin de maintenir une colonisation permanente.

Swords et al. (1993) ont évalué quantitativement et qualitativement, par des méthodes culturales, l'évolution du microbiote durant les 120 premiers jours de vie du porcelet. A l'âge de 3 jours, le microbiote intestinal du porcelet comprend une flore anaérobie stricte composée de nombreux *Bacteroides* (Stewart, 1997). Au cours de la suite du développement de l'animal, cet écosystème digestif microbien est similaire à celui de l'Homme, du bovin et des oiseaux durant les premières semaines de vie (Akkermans et al., 2003). Quelques jours après la naissance, les coliformes (Konstantinov et al., 2006) et les streptocoques dominent le microbiote digestif avant d'être remplacés par les bactéries anaérobies comme le montre la figure 5.

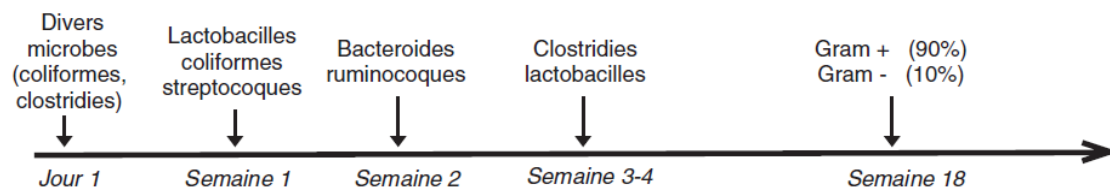


FIGURE 5. Succession temporelle des genres bactériens présents dans les fèces de porc au cours des premières semaines de vie (Lallès et al., 2004)

D'autres facteurs peuvent modifier l'implantation du microbiote chez le porcelet. Baker et al. (2013) ont montré que l'ajout de probiotiques dans l'alimentation de la truie entraînait la réduction des bactéries pathogènes chez la truie, et diminuait ainsi leur transmission directe de la truie au porcelet (effets bénéfiques sur la santé du porcelet) et les risques de contamination par l'environnement à la naissance. Un phénomène similaire avait été relaté par Mori et al. (2011) sur des porcelets en période de post-sevrage.

Selon d'autres auteurs, une trop grande hygiène d'animalerie pourrait entraîner une moins grande diversité du microbiote et donc une fonction immunitaire innée moins développée que celle observée dans des conditions d'élevage normales (Mulder et al., 2009; Inman et al., 2010). En effet, chez des porcs élevés dans un environnement naturel, l'établissement de leur microbiote intestinal, dominé par les lactobacilles et contenant un faible nombre de bactéries potentielle-

ment pathogènes, serait en faveur d'un bon développement de l'arsenal immunitaire du porcelet (Mulder et al., 2009).

1.2.2.2 Composition du microbiote

Le microbiote intestinal du porcelet a fait l'objet de recherches assez anciennes (Ducluzeau and Raibaud, 1975, 1994), en particulier dans le cadre de la comparaison (souvent effectuée à raison) entre microbiotes humains et porcins. Cet écosystème est différent d'un animal à l'autre et il est représenté par sa grande diversité (Leser and Mølbaek, 2009). Chez le porc adulte, la flore bactérienne des parties distales du tube digestif dépasse 10^{11} - 10^{12} bactéries viables par gramme de contenu frais, et elle est composée de populations principalement anaérobies comme le montre le tableau 6.

TABLEAU 6. Tableau de composition du microbiote du porc (Stewart, 1997)

Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèces
Actinobacteria	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>P. granulosum</i>
				<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>B. boum</i> <i>B. longum</i> <i>B. pseudolongum</i> <i>B. thermophilum</i>
		<i>Coriobacteriales</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Eggerthella</i>	<i>Eggerthella lenta</i>
				<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides amylophilus</i> <i>B. fragilis</i> <i>B. furcosus</i> <i>B. pyogenes</i> <i>B. suis</i> <i>B. uniformis</i>
Bacteroidetes	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>		
Firmicutes	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillales Family XI Incertae Sedis</i>	<i>Gemella</i>	<i>Gemella morbillorum</i>
		<i>Lactobacillales</i>	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus avium</i> <i>E. durans</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. hirae</i> <i>Enterococcus sp.</i> <i>Tetragenococcus halophilus</i>
			<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>L. agilis</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. fermentum</i>

Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèces
Firmicutes	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. johnsonii</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. salivarius</i> <i>Lactobacillus</i> sp.
				<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus alactolyticus</i> <i>S. equinus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. salivarius</i> <i>Streptococcus</i> sp.
				<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium botulinum</i> <i>C. perfringens</i> <i>Clostridium</i> sp.
				<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium rectale</i> <i>E. tenue</i> <i>Eubacterium</i> sp.
				<i>Butyrivibrio</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Butyrivibrio</i> sp.
	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
				<i>Faecalibacterium</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
				<i>Ruminococcus</i>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> <i>Ruminococcus</i> sp.
				<i>Faecalitalea</i>	<i>Faecalitalea cylindroides</i>
				<i>Megasphaera</i>	<i>Megasphaera elsdenii</i>
Fusobacteria	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacteriales</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
Proteobacteria	<i>GammaProteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
			<i>Enterobacteriaceae</i> sp.		

Le tractus gastro-intestinal de l'Homme et des porcs est colonisé par un large éventail de bactéries, levures et virus dont bactériophages (Sears, 2005). Pour les bactéries, il est dominé par des membres du phylum des Firmicutes et des Bacteroidetes (Mulder et al., 2009; Lamendella et al., 2011) (Figure 6).

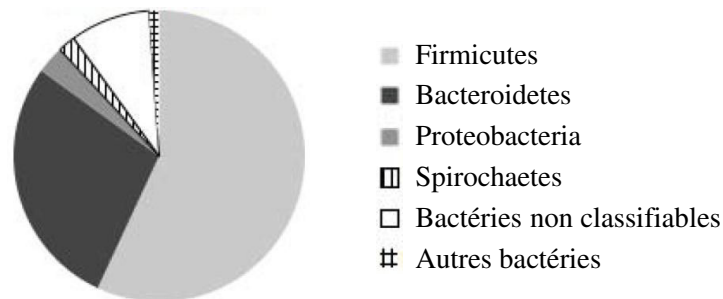


FIGURE 6. Répartition des grands phylums bactériens composant le microbiote fécal du porc, Lamendella et al. (2011) (répartition obtenue en utilisant des séquences de gènes d'ARNr 16S provenant de bases de données regroupant les métagénomés fécaux obtenus chez le porc).

Ceci étant, la composition du microbiote varie le long du tractus gastro-intestinal (Blachier et al., 2013) (Figure 7).

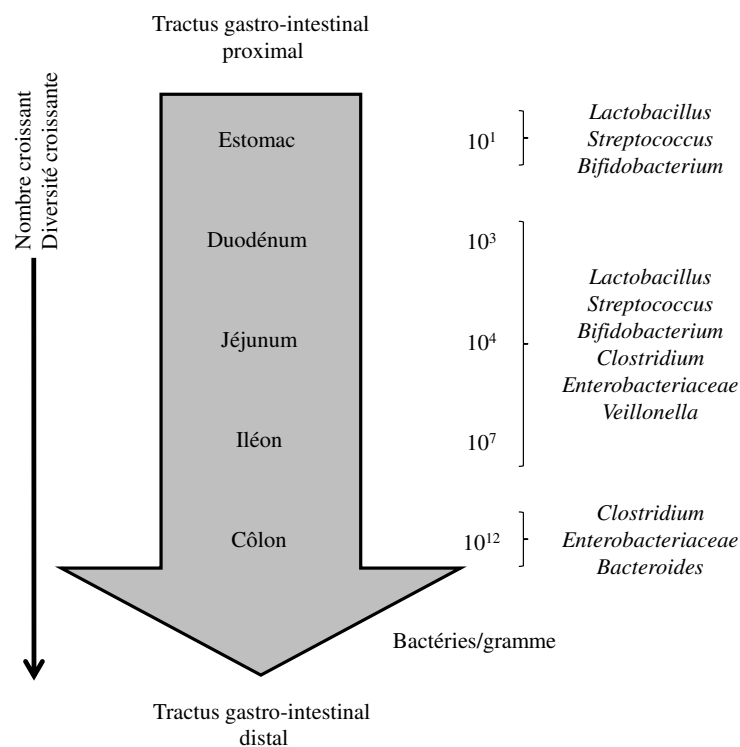


FIGURE 7. Genres bactériens majeurs et densité bactérienne présente dans les différents compartiments du tractus digestif du porc (Blachier et al., 2013)

Le microbiote intestinal doit être considéré comme un facteur essentiel dans le métabolisme de l'hôte, et les différences de composition du microbiote ont des répercussions importantes

sur le rendement énergétique global de l'alimentation, et donc sur le poids corporel (Vrieze et al., 2010). Les animaux élevés en l'absence de bactéries montrent un profond retard dans le développement de l'intestin adulte tant au niveau morphologique qu'immunitaire (Nanthakumar et al., 2003; Wagner, 2008). En effet, la grande quantité et la diversité de la communauté bactérienne intestinale offrent à l'hôte un grand nombre de fonctions métaboliques et jouent un rôle clé dans la santé de l'hôte ou au contraire l'apparition de maladies (Macfarlane and Macfarlane, 2007). En conditions de stabilité du microbiote, les bactéries normalement présentes vont empêcher l'installation de bactéries exogènes, qu'elles soient pathogènes ou non. Les acides gras à courte chaîne (AGCC), produits par les bactéries anaérobies (Hijova and Chmelarova, 2007) peuvent inhiber la croissance d'un grand nombre de bactéries pathogènes, qui préfèrent un environnement neutre ou légèrement alcalin pour leur croissance (Gibson and Wang, 1994). Cet impact du microbiote sur l'hôte a été décrit dans différentes études (Lallès et al., 2004; Leser and Mølbak, 2009) et il est présenté sur la figure 8.

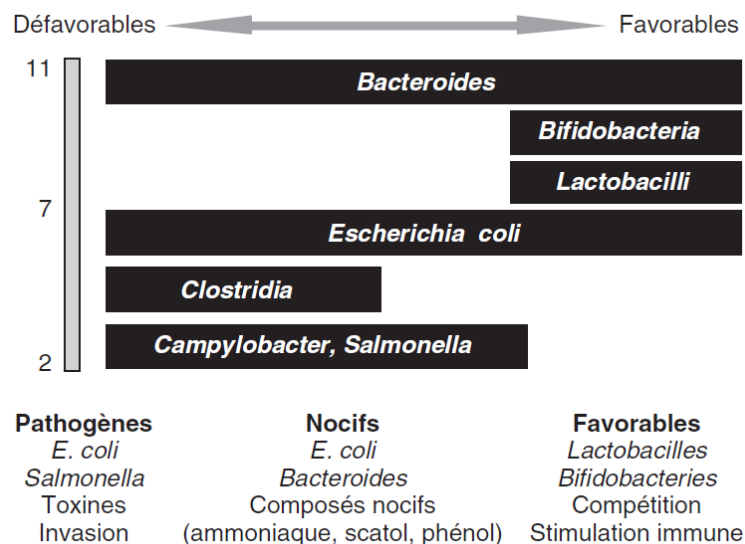


FIGURE 8. Principaux genres bactériens présents dans le microbiote intestinal du porc et leur influence sur l'Homme ou l'animal (Lallès et al., 2004)

Le microbiote joue un rôle essentiel pour l'hôte dans des domaines tels que la production de vitamines (Hooper et al., 2002), la production d'antibiotiques et d'antifongiques naturels, l'utilisation d'ingrédients alimentaires non digestibles (Ouwehand et al., 2002), la désintoxication de composants alimentaires et l'exclusion physique de certains pathogènes par recouvrement de la paroi intestinale (Madsen et al., 2001), la maintenance de la barrière intestinale (Roselli et al., 2007) ou encore la promotion de la réponse anti-inflammatoire.

L'alimentation reste le principal facteur impactant la composition du microbiote intestinal et sa fonctionnalité ainsi que la santé globale des animaux (Russell et al., 2013). Dans de nombreuses études, le porc a été choisi comme modèle pour appréhender les relations entre alimentation et microbiote (Heinritz et al., 2013).

1.2.2.3 Les facteurs influençant le microbiote

Différents facteurs peuvent avoir un impact positif ou négatif sur le microbiote, sa composition et son activité métabolique. En effet, certaines études ont montré l'influence de caractères génétiques du porc sur son microbiote intestinal avec par exemple, une corrélation entre les monocytes, plaquettes et hémoglobine et l'abondance des genres bactériens *Prevotella* et *Roseburia* (Estellé et al., 2014). Le régime alimentaire, l'âge des animaux et les conditions de santé du troupeau influent également sur la nature et la concentration des différentes populations bactériennes présentes dans le tractus gastro-intestinal porcin (Gaskins, 2001; Leser et al., 2000; Moore et al., 1987; Robinson et al., 1984; Varel et al., 1987). Notons pour exemple que l'utilisation d'aliments expérimentaux composés de fibres alimentaires diverses (riz, amidon de pomme de terre, ...) a eu un effet sur la composition du microbiote intestinal et en particulier sur certains *Bacillus* et *Prevotella*. Ces derniers ont un effet synergique avec *Brachyspira hyodysenteriae*, bactérie responsable de dysenterie chez le porc (Leser et al., 2000). De même, les conditions d'élevage peuvent avoir un impact sur l'implantation et la prévalence de certaines bactéries comme *Salmonella* ou encore *Campylobacter* (Baer et al., 2013).

1.2.2.4 Le microbiote en période de post-sevrage

Ce microbiote complexe doit permettre une adaptation rapide aux éventuels changements de l'environnement (Marchesi and Shanahan, 2007). Au moment du sevrage, les conditions de vie du porcelet vont radicalement changer et les différents stress vont conduire à des déséquilibres physiologiques et donc à des troubles de la croissance (Rose et al., 2003).

Des changements brutaux de composition et d'activité du microbiote du tractus gastro-intestinal après sevrage sont considérés comme un facteur de prédisposition des animaux aux infections par les bactéries pathogènes (Hopwood and Hampson, 2003). En effet, le changement d'alimentation induit une déstabilisation du microbiote (Konstantinov et al., 2004). Une diminution des bactéries anaérobies à Gram positif va entraîner, entre autres, l'augmentation d'espèces à Gram négatif du genre *Bacteroides* et du nombre de coliformes présents dans le microbiote en période de post-sevrage (Hampson et al., 1985). De plus, un sevrage précoce induirait des changements dans la composition et les activités métaboliques du microbiote ainsi que l'émergence de *Clostridium* et de *E. coli* (Konstantinov et al., 2006).

Ces perturbations du microbiote vont alors s'accompagner de problèmes très fréquemment rencontrés en période de post-sevrage, tels que l'apparition de diarrhées, l'arrêt de la croissance, voire une augmentation de la mortalité au sein de l'élevage.

1.2.3 Les différentes méthodes d'étude du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal, de l'Homme ou de l'animal, est depuis longtemps un sujet d'intérêt pour les scientifiques. A la fois chez l'Homme et le porc, les techniques culturelles ont permis d'obtenir les premières compositions partielles du microbiote intestinal de l'individu ciblé. Plus

récemment, de nouvelles méthodes d'analyses moléculaires ont vu le jour et sont de plus en plus utilisées.

1.2.3.1 Les méthodes culturales

Les premières études du microbiote intestinal du porc ont été effectuées à la fin des années 70 par cultures anaérobies (Salanitro et al., 1977). A cette époque, il est déjà admis que 90% des bactéries isolées dans le gros intestin sont des bactéries à Gram positif dont principalement des coques à Gram positif, des lactobacilles et des clostridies (Russell, 1979). Allison et al. (1979) se sont intéressés aux substrats utilisés par les bactéries composant cet écosystème digestif et ils ont montré que ces dernières pouvaient utiliser une grande diversité de substrats (glucose, amidon, xylose, mucine gastrique de porc, glycérol, lactate, ...). Grâce à leurs caractéristiques spécifiques, des cultures sur milieux sélectifs peuvent permettre la différenciation de genres bactériens particuliers.

En parallèle de ces milieux sélectifs, des cultures sous atmosphères sélectives peuvent également permettre une sélection par méthode culturale. Robinson et al. (1981) ont mis en évidence grâce à des cultures en « roll tubes » (tubes en anaérobiose de Hungate), la présence de *Bacteroides* dans l'intestin de porcs. Cette technique a été aussi utilisée pour comparer le microbiote de porcs sains à celui de porcs malades et les différencier par la présence de la bactérie anaérobiose pathogène *Brachyspira hyodysenteriae* (Robinson et al., 1984). Les auteurs ont montré qu'il y avait adhérence à l'épithélium du côlon de bactéries à Gram positif chez les animaux sains contrairement aux animaux malades qui eux, présentaient une prédominance de bactéries à Gram négatif adhérent à cette partie de l'intestin. Les « roll tubes » ont aussi été utilisés pour la culture anaérobiose et ont également servi à comparer les flores intestinales du porc et de l'Homme (Moore et al., 1987). D'autres études ont été effectuées grâce à des « chambres de Freter » (Freter, 1983), plus connues aujourd'hui sous le nom d'« enceinte anaérobiose ».

La sélectivité recherchée a été obtenue à l'aide d'atmosphères contrôlées, par exemple pour les bactéries anaérobies, les microaérophiles (*Campylobacter*, *Helicobacter*, ...), les capnophiles et les bactéries exigeantes en CO₂ (*Neisseria*, *Haemophilus*, ... dans d'autres environnements). De même, des caractéristiques métaboliques spécifiques peuvent servir de critères pour la sélectivité de bactéries en atmosphères contrôlées. Citons la capacité de dégrader certains éléments (Krause et al., 1994) ou d'utiliser certains gaz comme source de carbone (Doré et al., 1995) comme par exemple l'utilisation d'hydrogène et de dioxyde de carbone par les bactéries acétogènes pour produire de l'acétate).

Les techniques de culture étant laborieuses et comportant certaines limites, notamment pour l'évaluation de communautés microbiennes complexes dont certaines sont non cultivables, des méthodes moléculaires ont été mises en place.

1.2.3.2 Les méthodes de biologie moléculaire

Avec l'ère de la biologie moléculaire, se sont développées de nombreuses techniques conduisant à l'identification qualitative et/ou quantitative des microorganismes présents dans les différents écosystèmes complexes.

La méthode dite PCR pour « Polymerase Chain Reaction », qui consiste en l'amplification d'une région spécifique de l'ADN (Acide désoxyribonucléique), ou des méthodes dérivées de cette technique de base dont certaines font appel à une première étape de PCR, ont été et sont toujours largement utilisées. Elles permettent l'identification, voire la quantification de gènes spécifiques ciblés présents en faible quantité.

Parmi elles, des techniques de différenciation de communautés microbiennes, dites aussi techniques d'empreintes analogues, existent. La DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis), qui a été utilisée chez le porc (Simpson et al., 1999), est une méthode d'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant. Elle est relativement rapide pour évaluer d'éventuelles différences de profils microbiens au sein de communautés complexes. De même, la TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) ou encore la TTGE (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis) permettent aussi d'obtenir des profils représentant une réelle diversité de l'écosystème observé, à l'aide respectivement d'un gradient de température sur le gel d'électrophorèse ou d'une température augmentant graduellement au cours de la migration. La technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) fait appel à une dénaturation thermique des brins d'ADN pour analyser les structures secondaires des ADN simple brin. Elle a été sélectionnée pour l'évaluation de l'impact de mycotoxines sur le microbiote intestinal de porcs (Burel et al., 2013). Pour toutes ces techniques, l'intensité des bandes peut être utilisée comme marqueur semi-quantitatif de l'abondance relative de certaines séquences dans la communauté. Cependant, elles ne permettent de détecter que les bactéries dominantes, soit environ 1% de la communauté bactérienne totale (Zoetendal et al., 2004).

Des outils de quantification sont aussi utilisés pour étudier le microbiote intestinal du porc. La PCR quantitative en temps réel (qPCR), directement dérivée de la technique de base PCR, permet d'évaluer l'abondance relative de certaines bactéries au sein d'une communauté (Furet et al., 2009). C'est la meilleure méthode, à l'heure actuelle, de quantification de communautés microbiennes complexes si l'on se limite aux paramètres de coût et de temps.

Une autre technique nommée RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) est aussi utilisée. Elle est basée sur l'analyse de profils obtenus après digestion enzymatique de l'ADN par des enzymes de restrictions. Cette méthode a été par exemple choisie pour évaluer l'impact d'un aliment sur la composition du microbiote du porc (Pedersen et al., 2013).

Afin d'avoir un aperçu de la structure et de la dynamique des populations, des outils de puces phylogénétiques ont été développés. Particulièrement puissants, ils ne peuvent être conçus qu'à partir de bases déjà disponibles et ont été utilisés pour l'analyse de la diversité du microbiote présent dans le tractus digestif du porc dans différentes études (Thanantong et al., 2006;

Pérez Gutiérrez, 2010; Haenen et al., 2013b,a).

Enfin, des technologies de séquençage telles que le pyroséquençage 454 et, plus récemment, le séquençage Illumina, MiSeq ou encore HiSeq sont des méthodes d'analyse sans *a priori* qui se développent de plus en plus. Ces outils de séquençage, de plus en plus performants, permettent d'obtenir de nouveaux indices non encore explorés concernant la composition de communautés microbiennes complexes. Le séquençage de l'ADNr 16S pour l'analyse des communautés bactériennes de l'intestin chez le porc (Pryde et al., 1999) et, plus précisément, le séquençage basé sur la petite sous-unité de l'ADNr (16S), comportant des régions conservées et des régions variables, ont permis de comparer aussi bien des espèces éloignées que des espèces proches.

Plusieurs publications ont comparé les principales techniques d'étude du microbiote intestinal du porc comme par exemple celles de Leser et al. (2002) ou celle de Foster et al. (2012).

Actuellement, un projet global nommé « *Sus Flora* », mené par l'unité MICALIS de l'INRA de Jouy-en-Josas, vise à caractériser du mieux possible le microbiote intestinal du porc. Ces données permettront certainement, entre autres, de comprendre comment la génétique de l'hôte est impliquée dans la composition et le développement de la flore intestinale du porc (Estellé et al., 2014).

Chapitre 2

Les antibiotiques utilisés en élevage porcin

Sommaire

2.1	Antibiotiques, définitions, réglementation	33
2.2	Usage des antibiotiques en production porcine	35
2.3	Focus sur la colistine et mécanismes de résistance	44
2.4	Focus sur les C3G et mécanismes de résistance	51
2.4.1	Les céphalosporines : définition, utilisation chez le porc	51
2.4.2	Résistance aux céphalosporines : mécanismes, prévalence et facteurs de risque	54

2.1 Antibiotiques, définitions, réglementation

Selon la définition de l'OMS (WHO, 2011), un antimicrobien est une substance d'origine naturelle, semi-synthétique ou synthétique qui, à faible concentration, tue ou inhibe la croissance de micro-organismes, mais n'affecte pas (ou peu) l'hôte. Un antibiotique est un anti-bactérien utilisé pour traiter des infections chez l'Homme ou chez l'animal.

L'usage des antibiotiques comme facteurs de croissance ayant été progressivement abandonné en Europe (mis à part certains antibiotiques ionophores encore autorisés comme additifs coccidiostatiques), les antibiotiques sont utilisés actuellement, pour les productions animales, uniquement en tant que médicaments vétérinaires. A ce titre, ils sont évalués dans le cadre de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) du point de vue de leur qualité, leur sécurité et leur efficacité thérapeutique. Le fabricant doit également avoir déterminé le temps d'attente nécessaire pour éviter la présence de résidus (molécules mères ou métabolites) nocifs dans les denrées (viandes, lait, œufs. . .). L'AMM est délivrée si le rapport bénéfice/risque est jugé favorable, le risque prenant en compte l'ensemble des aspects relatifs à la santé humaine, la santé animale et l'environnement (Sanders et al., 2011). L'AMM précise notamment l'espèce de destination, la posologie, les indications et contre-indications ainsi que le temps d'attente.

En France, seuls les vétérinaires sont autorisés à prescrire des médicaments vétérinaires, soit, après un examen clinique systématique des animaux, soit, sous certaines conditions, dans le cadre d'un suivi sanitaire d'élevage pour les animaux producteurs de denrées ou destinés à la commercialisation. Cette prescription est matérialisée par la rédaction d'une ordonnance qui détaille en particulier, les animaux destinataires, le détenteur des animaux, la dénomination du médicament, le mode d'emploi, la posologie et le temps d'attente (Chauvin, 2009; Poncet, 2013). Si aucun médicament correspondant à une situation clinique particulière n'est disponible, selon la procédure dite de la cascade (article L5143-4 du CSP, transposant la directive 2004/28), il est possible de prescrire, par exemple, « un médicament autorisé pour des animaux d'une autre espèce dans la même indication thérapeutique, ou pour des animaux de la même espèce dans une indication thérapeutique différente ou un aliment médicamenteux fabriqué à partir d'un prémélange médicamenteux autorisé répondant aux mêmes conditions ».

La délivrance du médicament vétérinaire peut être effectuée par le vétérinaire ou d'autres ayants droit, tels que les pharmaciens d'officine; sous certaines conditions, les structures de production agréées, peuvent aussi délivrer des antibiotiques par le biais de leur vétérinaire, sur ordonnance et dans le cadre de leur plan sanitaire d'élevage (Pinault et al., 2008); enfin, dans le cas de la prescription d'un aliment médicamenteux, ce sont les fabricants d'aliments médicamenteux pour animaux d'élevage qui délivrent l'antibiotique. Toutefois, certaines de ces possibilités pourraient se voir restreintes dans le cadre de la loi n° 2014-1170 du 13 octobre 2014 d'avenir pour l'agriculture, l'alimentation et la forêt (Vandaele, 2014). Des mesures particulières pourraient également être prises pour réduire la prescription et l'utilisation d'antibiotiques dits critiques. En effet, l'OMS a catégorisé certaines familles d'antibiotiques comme particulièrement importantes pour la santé humaine : ainsi les fluoroquinolones, céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} générations, macrolides et glycopeptides ont été classés d'importance critique (« critically important antimicrobials », WHO (2011)). Parallèlement l'Office International des Épizooties (OIE) a défini les molécules importantes pour la santé animale; la liste « d'agents anti-microbiens d'importance critique en médecine vétérinaire » comprend, par exemple et de façon non exhaustive, pour les suidés, les aminoglycosides, le ceftiofur, le cefquinome, la tula-thromycine et différentes fluoroquinolones; la colistine appartient aux « agents antimicrobiens très importants » pour les suidés (Office International des Epizooties, 2012).

Dans les élevages, différentes modalités de traitement peuvent être rencontrées, en fonction du (des) stade(s) infectieux des animaux. Nous retenons ici les définitions proposées par le récent rapport de l'Anses concernant les « Risques d'émergence d'antibiorésistances liés aux modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale » (Anses, 2014) :

- « Préventif » : traitement prophylactique appliqué à des animaux sains, exposés à un facteur de risque pour la maladie infectieuse. Le traitement préventif peut être individuel ou collectif;

- « Métaphylactique » : traitement des animaux cliniquement malades et des autres animaux d'un même groupe qui sont encore cliniquement sains mais avec une forte probabilité d'être infectés à cause du contact étroit avec les animaux malades ;
- « Curatif » : traitement individuel ou collectif des seuls animaux présentant les symptômes d'une maladie.

Selon le rapport précédemment cité (Anses, 2014), le traitement purement préventif fait partie des pratiques à risque qu'il convient d'abandonner, immédiatement ou à terme, compte tenu d'un rapport bénéfice / risque défavorable. Le traitement métaphylactique, souvent décrié par les médias, présente l'avantage de concerner non seulement des animaux malades, mais également des animaux en incubation, chez lesquels la taille de la population bactérienne pathogène est encore réduite et donc a priori plus facile à éradiquer, et ce, avec moins de risque de sélection de bactéries résistantes ; de plus, lors d'un traitement par eau de boisson ou par aliment, ces animaux en incubation sont moins à risque de sous-consommation, et donc de sous-dosage, que les animaux malades. La sous-consommation fréquente chez les sujets malades engendre un risque de faible efficacité et de sélection de souches résistantes. Enfin, le traitement curatif se justifie de façon évidente eu égard au bien-être animal.

2.2 Usage des antibiotiques en production porcine

Pour mieux évaluer quantitativement et qualitativement les traitements antibiotiques administrés aux animaux, l'OIE a édité des recommandations sur le « Contrôle des quantités d'agents antimicrobiens utilisées chez les animaux dont la chair ou les produits sont destinés à la consommation humaine et détermination des profils d'utilisation » (Office International des Epizooties, 2012). De même, le plan EcoAntibio 2017 (Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2012) a un objectif de réduction de 25% des usages d'antibiotiques en cinq ans et prévoit, parmi les 40 mesures proposées, de « poursuivre le suivi des ventes d'antibiotiques et de l'exposition, créer un observatoire de l'utilisation au sein de l'Anses-ANMV (Agence Nationale du Médicament Vétérinaire) et analyser les données relatives aux aliments médicamenteux » (mesure 34) et de « Mettre en place des enquêtes régulières sur des échantillons représentatifs de vétérinaires et d'éleveurs et étendre les enquêtes de pharmaco-épidémiologie à toutes les filières » (mesure 35). Au niveau européen, cet objectif s'inscrit dans une démarche européenne coordonnée par l'Agence Européenne du Médicament, dans le cadre du projet ESVAC : « European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption » (EMA, 2014).

Mais bien connaître l'usage des antibiotiques dans les filières de production animales se révèle relativement difficile. Au niveau quantitatif, se pose d'abord le problème du choix des unités ou indicateurs les plus pertinents : ainsi selon Chauvin et al. (2001), plusieurs systèmes : unités monétaires (en euros), unités commerciales (flacons,...), unités pondérales (mg ou UI), unités thérapeutiques (« animal daily dose » ou doses journalières), nombres ou fractions d'animaux traités,... peuvent décrire les quantités utilisées ou les animaux exposés mais l'obtention, l'in-

interprétation et la comparaison de ces données sont souvent complexes et tributaires de l'unité choisie (Chauvin et al., 2008; Postma et al., 2015). En France, depuis 1999, l'ANMV réalise le suivi des ventes d'antibiotiques basé sur les déclarations des titulaires d'AMM, en accord avec le SIMV (Syndicat de l'Industrie du Médicament et réactif Vétérinaires). En prenant ensuite en compte différents éléments tels que l'estimation de la part des ventes pour chaque espèce de destination, les quantités de principes actifs, les données de populations animales, de posologies et durées de traitement recommandées, il est possible de déduire plusieurs indicateurs tels que la quantité de matière active par kg produit ou encore l'ALEA (Animal Level of Exposure to Antimicrobials). Au niveau national, les résultats de ces suivis sont disponibles (rapports annuels de l'ANMV disponibles sur le site de l'Agence) et le dernier de ces rapports montre ainsi que les porcs restent parmi les plus forts consommateurs d'antibiotiques (tableaux 7 et 8). Toutefois, il faut souligner que le tonnage 2013 a diminué de 59,8% par rapport à celui de 1999 et de 45,9% par rapport à celui de 2009 (Anses-ANMV, 2014).

TABLEAU 7. Répartition des ventes 2013 entre les différentes espèces en tonnage de matière active et en quantité de matière active par kilogramme animal (Anses-ANMV, 2014)

	Bovins	Chats et chiens	Chevaux	Poissons	Lapins	Ovins et caprins	Porcs	Volailles	Autres	Total
Tonnage vendu	147,17	15,17	15,31	2,86	52,46	45,16	262,12	156,57	2,27	699,09
Pourcentage	21,10%	2,20%	2,20%	0,40%	7,50%	6,50%	37,50%	22,40%	0,30%	100%
Ventes en mg/kg	15,81	96,68	51,44	63,57	517,57	78,93	91,3	85,6	65,25	45,95

TABLEAU 8. Répartition des ventes 2013 entre les différentes espèces en tonnage de poids vif traité et en indicateur du niveau de l'exposition ALEA (Anses-ANMV, 2014)

	Bovins	Chats et chiens	Chevaux	Poissons	Lapins	Ovins et caprins	Porcs	Volailles	Autres	Total
Poids vif traité ¹	2,84	0,10	0,11	0,01	0,27	0,23	2,73	2,04	0,02	8,36
Pourcentage	34,00%	1,30%	1,30%	0,10%	3,30%	2,80%	32,60%	24,40%	0,20%	100%
ALEA ²	0,305	0,668	0,366	0,178	2,701	0,404	0,951	1,117	0,525	0,55

¹ Exprimé en tonnes
² Animal Level of Exposure to Antimicrobials

Les données collectées par l'ANMV permettent également d'observer l'évolution des familles d'antibiotiques vendues. Ainsi, il est montré que l'exposition des porcs aux antibiotiques a diminué de 27,7% sur les 5 dernières années. Les antibiotiques les plus utilisés sont les tétracyclines et les polypeptides (essentiellement constitués par la colistine) comme le montre la figure 9.

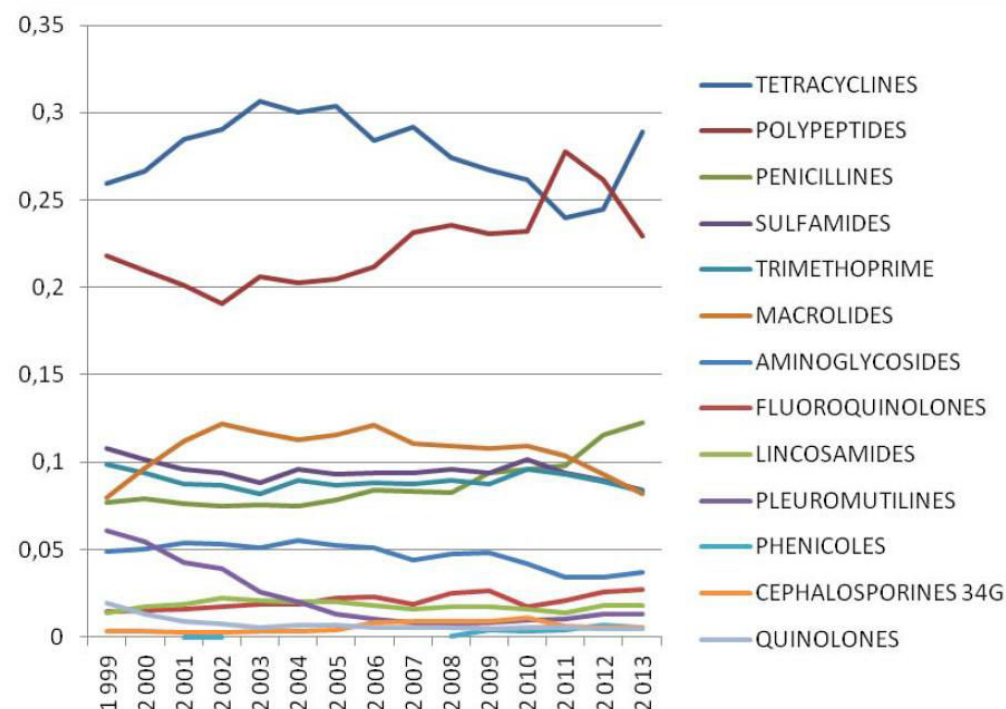


FIGURE 9. Évolution de la part des familles d'antibiotiques dans le poids vif traité des porcs (Anses-ANMV, 2014)

Au niveau international, les données de ventes permettent une comparaison entre pays. Ainsi Grave et al. (2010) publient l'analyse des données de ventes de 2007, et rapportent que la France se situait au deuxième rang, parmi dix pays européens, pour les ventes d'antibactériens calculés en mg de matière active par kg de viande de porc, poulet et ruminant (figure 10).

Plus récemment, le rapport ESVAC (EMA, 2014) souligne que, exprimés en mg/PCU (une approximation de la taille de la population animale), les ventes d'antimicrobiens, ont diminué de 22% en France en 2012, en comparaison à 2010. Le rang de la France se situe maintenant à un niveau beaucoup plus « moyen » par rapport aux 25 autres pays (figure 11).

Pour mieux connaître les usages en élevage (animaux destinataires, âges des animaux traités, indications, types de structure d'élevage, facteurs de risque de forte consommation, posologies effectives,...), certains pays disposent de systèmes exhaustifs d'enregistrement de toutes les prescriptions d'antimicrobiens, ce qui permet, par exemple de mettre en évidence des évolutions temporelles des consommations ou de rechercher les profils des plus forts utilisateurs. Ainsi, au Danemark, Vieira et al. (2011) utilisent les données du système VetStat et de production des élevages de porcs pour montrer qu'entre 2002 et 2008, les prescriptions de tétracyclines ont augmenté de 0,28 à 0,70 dose-animal-jour/100 porcs et que les petits élevages sont plus souvent consommateurs de tétracyclines, macrolides, triméthoprim-sulfamides et céphalosporines que les élevages de taille plus importante. Ce même système VetStat permet de mettre en évidence l'augmentation significative (+ 22% dans les trois mois suivant infection) de l'usage des antibiotiques lors de l'infection par le circovirus de la maladie de l'amaigrissement du porcelet (Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS)) dans les élevages atteints (Jensen et al., 2010; Vigre et al., 2010).

Enfin, Jensen et al. (2012) observent que chez le porcelet en post-sevrage ou en engraissement, les infections gastro-intestinales représentent respectivement 74-83% et 56-65% des usages d'antibiotiques, suivies par les infections respiratoires qui totalisent respectivement 9-17% et 18-24%.

Mais lorsque de tels dispositifs d'enregistrement ne sont pas mis en place, il est nécessaire de mener des enquêtes directement auprès des prescripteurs ou des utilisateurs. De Briyne et al. (2013) se sont intéressés aux critères de choix de prescription des antibiotiques et ont réalisé une enquête auprès de 3004 vétérinaires de 25 plusieurs pays européens dont la France (De Briyne et al., 2013). Il en ressort que le choix de l'antibiotique par le praticien est surtout influencé par les tests de sensibilité (mais ceux-ci sont généralement effectués après échec thérapeutique), l'expérience du prescripteur, le risque d'émergence de résistance et la facilité d'administration. En 2000, Chauvin et al. (2002) réalisent une étude auprès des vétérinaires exerçant en production porcine, ce qui permet de décrire les posologies effectives : par exemple, selon les réponses obtenues dans l'enquête, la dose moyenne de colistine prescrite est de 132×10^3 UI/kg de poids vif pendant 9,4 jours, (alors que l'AMM recommande 100 000 UI/jour pendant 5 jours) et ce polypeptide est quasi exclusivement utilisé pour le contrôle d'infections digestives.

Plus récemment, les données enregistrées grâce au panel INAPORC constitué de 169 élevages représentatifs de la production porcine française ont permis de confirmer la part importante, en 2010, des traitements antibiotiques ciblant les infections digestives chez le porc en croissance, les infections respiratoires en post-sevrage et en engraissement, et les problèmes locomoteurs

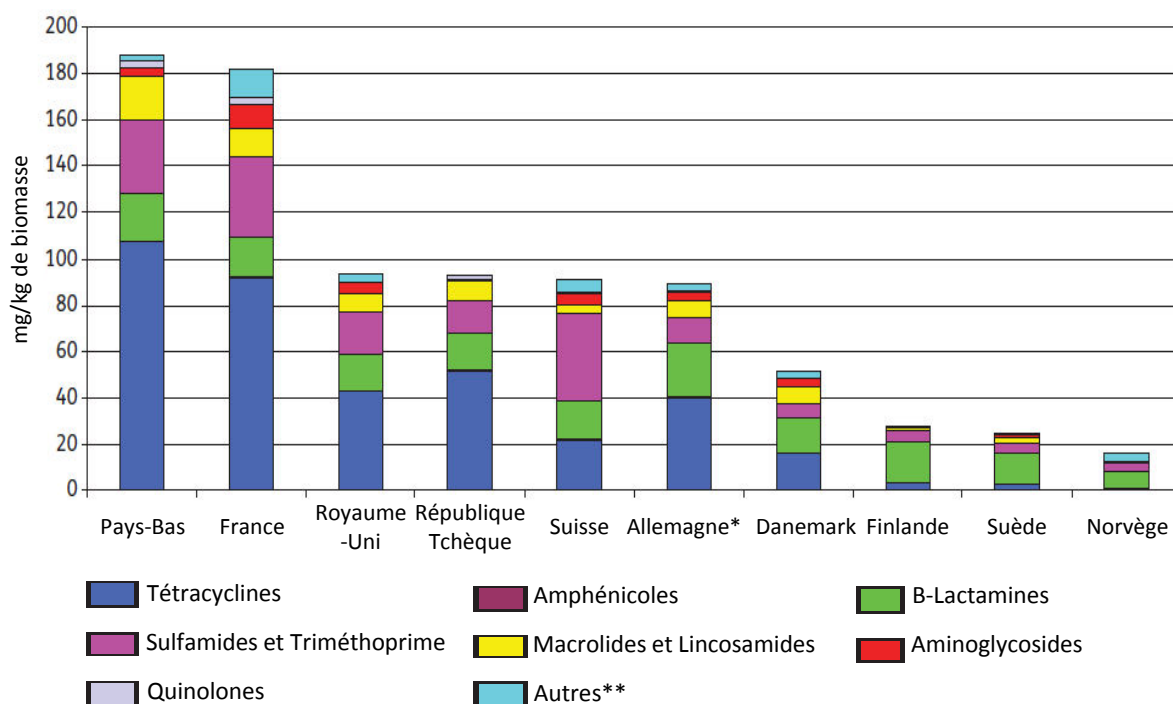


FIGURE 10. Taux, en mg, d'agents antimicrobiens vétérinaires vendus en 2007 par kg de biomasse de viande de porc, de volailles et de bovins (d'après Grave et al. (2010)), * Données de 2005, ** Les substances incluses peuvent varier d'un pays à l'autre

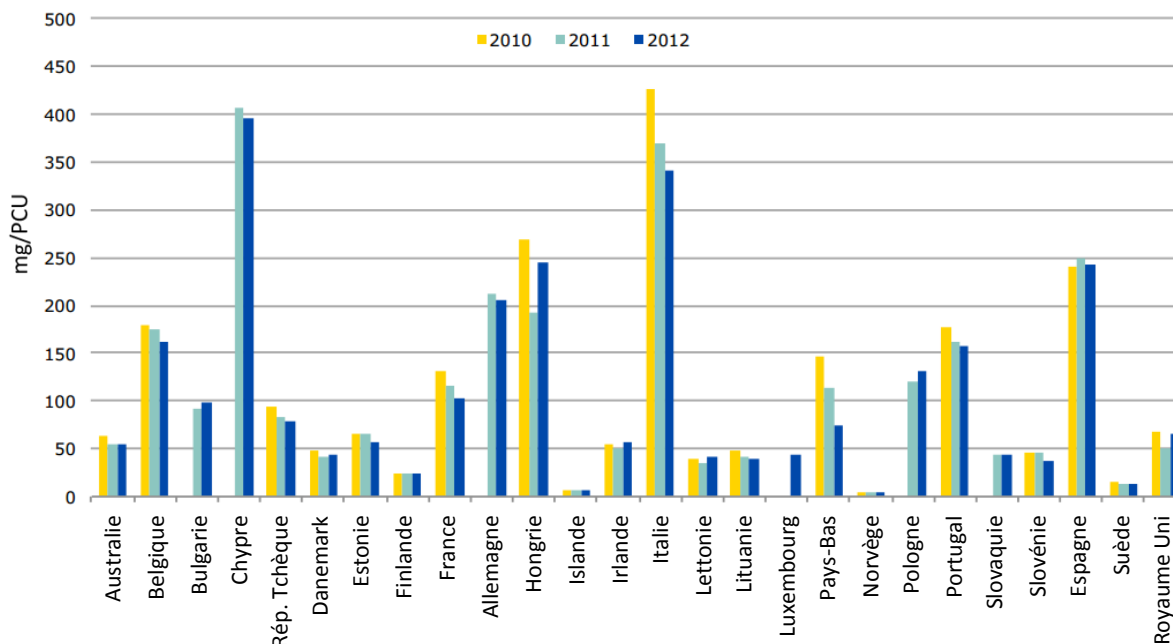


FIGURE 11. Ventes totales d'agents antimicrobiens vétérinaires pour les espèces productrices de denrées alimentaires (y compris les chevaux) en mg/PCU, au cours des années 2010 à 2012, pour 26 pays de l'UE (EMA, 2014)

des porcelets en maternité (Hémonic et al., 2014). Il est également observé que la posologie de la colistine est délibérément et couramment augmentée d'un facteur 1,8.

Ces informations sont globalement en accord avec les cartographies proposées par les experts pour la production porcine dans le cadre de la saisine Antibiorésistance (Anses (2014), figures 12 et 13) et avec les résultats des suivi de ventes d'antibiotiques fournis par l'ANMV (Anses-ANMV, 2014). En effet, ces cartographies confirment, par exemple, la fréquence d'utilisation de la colistine pour les infections digestives en post-sevrage, qu'elle soit administrée par voie orale ou sous forme de prémélanges.

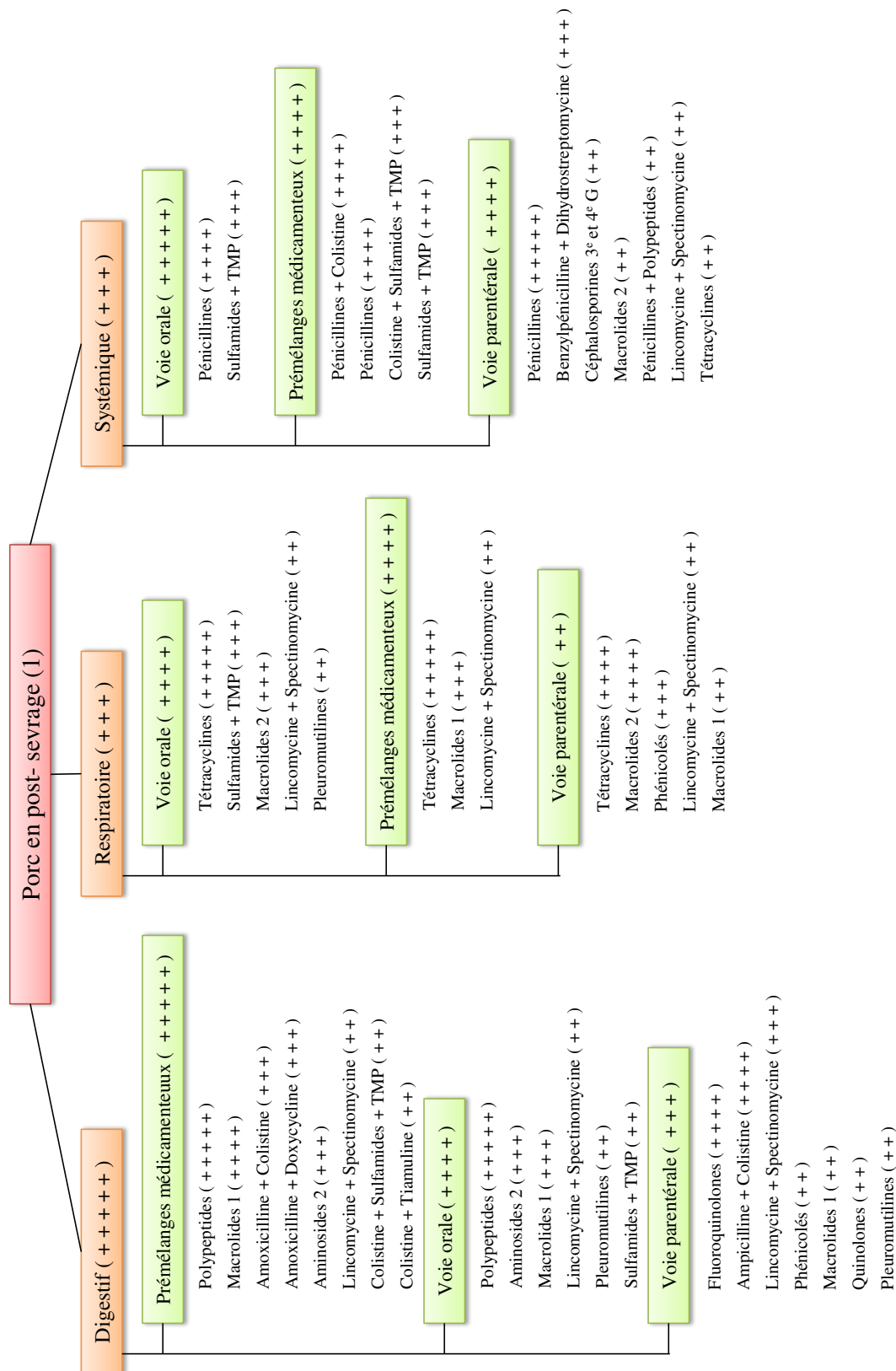


FIGURE 12. Cartographie de l'utilisation d'antibiotiques chez le porc en période de post-sevrage, pour des traitements digestifs, respiratoires ou systémiques (Anses, 2014)

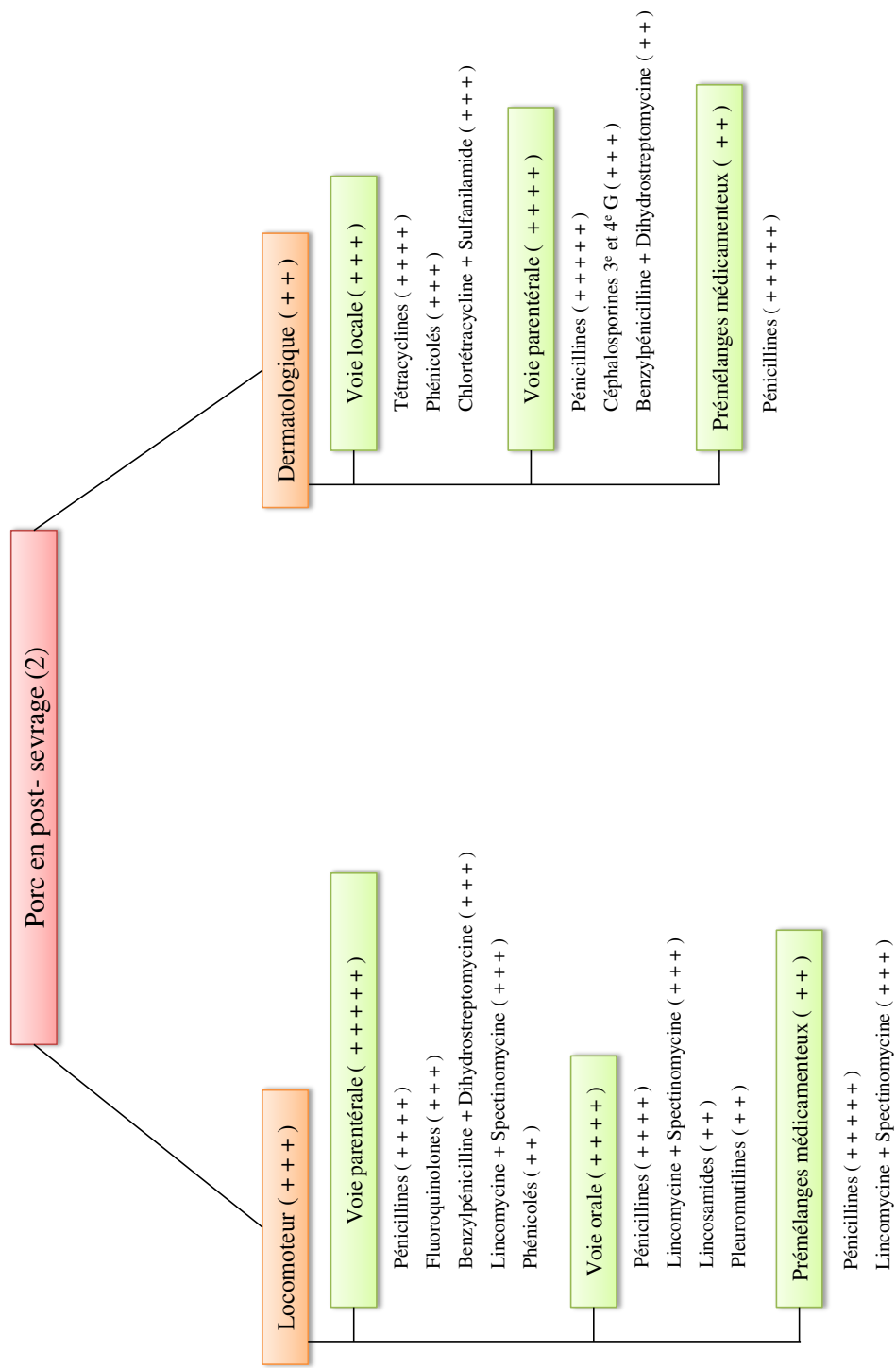


FIGURE 13. Cartographie de l'utilisation d'antibiotiques chez le porc en période de post-sevrage, pour des traitements locomoteurs ou dermatologiques (Anses, 2014)

En Belgique, en 2003, une enquête concernant 821 lots de porcs montre que l'incidence de traitements (oraux et injectables compris) s'élève à 178,1 doses-animal-jour pour 1000 porcs, et de 50 à 75% des traitements par voie orale sont sous-dosés, alors que plus de 90% des traitements par injection sont sur-dosés (Timmerman et al., 2006). Plus récemment en 2010, dans ce même pays, il est montré que la colistine est le traitement collectif donné par voie orale le plus fréquent (30,7%), suivi par l'amoxicilline (30,0%); pour les traitements par injection, la première place revient à la tulathromycine (45,0%) suivie du ceftiofur longue-action (40,1%).

Il est aussi souligné que des traitements préventifs collectifs sont mis en place dans 98% des lots visités et incluent souvent des antibiotiques d'importance critique ou à large spectre. Aux Pays-Bas, en 2010, le rapport Maran (Maran, 2011) rapporte qu'en moyenne un porcelet est traité pendant 19 jours depuis sa naissance jusqu'à son transfert en engraissement à 74 jours. En Espagne, Moreno (2012) présente un sondage réalisé sur une centaine d'élevages qui indique que 90% des porcs de ferme d'engraissement et 54% des animaux de naisseurs-engraisseurs sont exposés aux antibiotiques; respectivement 61% et 33% reçoivent de la colistine et 62% et 23% de la doxycycline.

Ces différents résultats sont essentiellement basés sur des enquêtes dans des élevages conventionnels largement majoritaires. Mais il faut aussi mentionner que certains secteurs de la production porcine sont très peu consommateurs en raison de cahiers des charges plus stricts : ainsi dans la production biologique, qui représente 0,6% du cheptel de truies (Legendre et al., 2013), un animal dont la durée de vie est inférieure à un an ne doit pas recevoir plus d'un traitement, et la période de retrait avant abattage est doublée (EC 889/2008, Communauté Européenne (2008)).

Par ailleurs, certains opérateurs développent maintenant des productions de porcs « garantis élevés sans antibiotique dès la fin du sevrage », afin de répondre à la demande des consommateurs (Gérard, 2014) ou sous la pression des distributeurs.

2.3 Focus sur la colistine et mécanismes de résistance

Cette partie a fait l'objet d'une revue publiée en 2013 qui présente un état des lieux des connaissances concernant la colistine dans les filières avicoles et porcines en Europe. L'utilisation de la colistine en élevage et les mécanismes de résistance chez les entérobactéries vis-à-vis de cet antibiotique sont également abordés.

La figure 14 montre l'évolution des proportions annuelles de *E. coli* résistants en fonction de l'espèce animale ciblée par le traitement. Cette figure (Jarrige et al., 2014) permet d'actualiser les données présentées dans la revue.

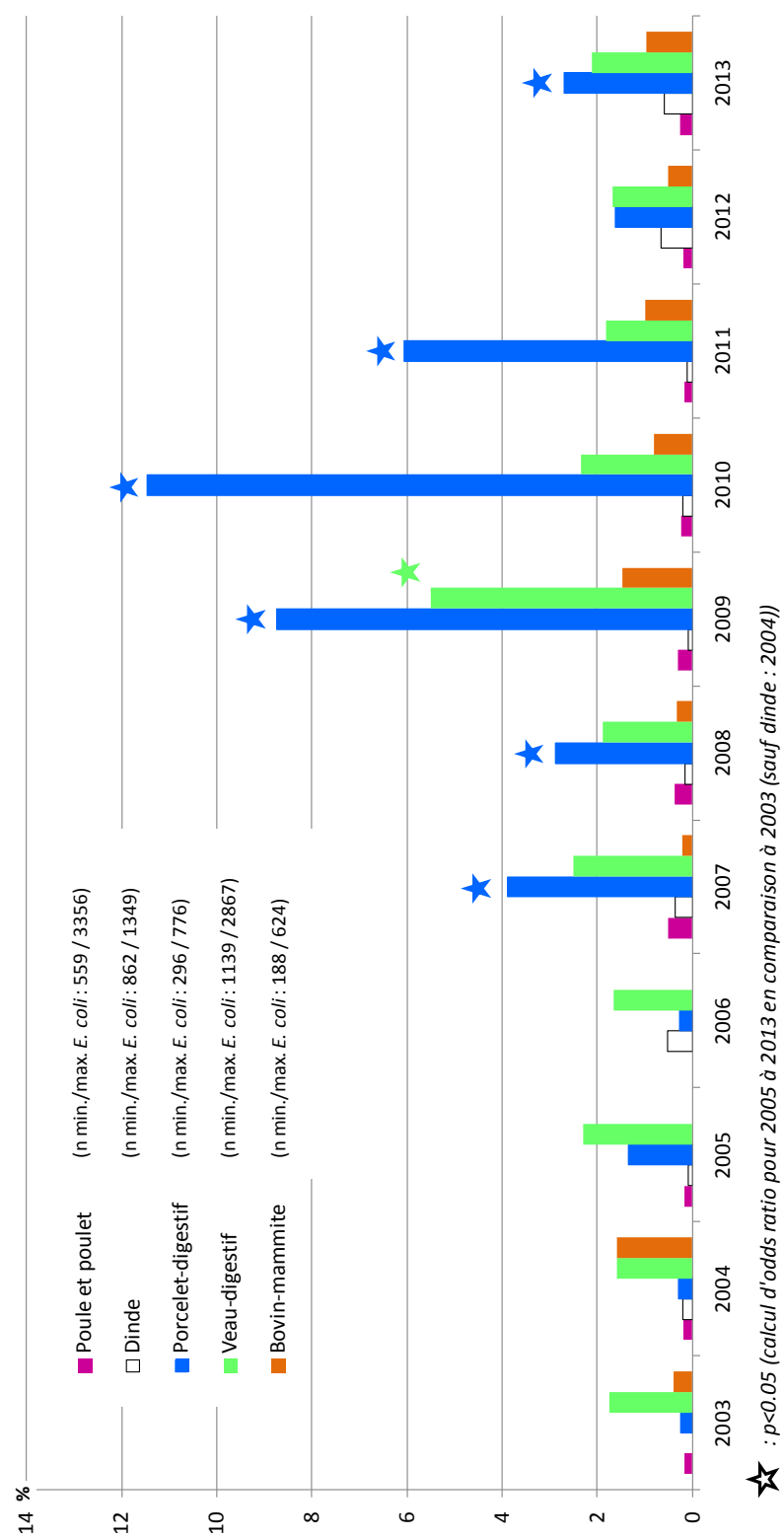


FIGURE 14. Evolution des proportions annuelles de *E. coli* présentant une zone d'inhibition de diamètre inférieur à 15 mm vis-à-vis de la colistine (disque 50 µg) (Jarrige et al., 2014)



What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe?



Isabelle Kempf^{a,b,*}, Mickaël Alain Fleury^{a,b}, Djamel Drider^c, Mireille Bruneau^d, Pascal Sanders^d, Claire Chauvin^{a,b}, Jean-Yves Madec^e, Eric Jouy^{a,b}

^a ANSES, Ploufragan-Plouzané Laboratory, BP 53, 22440 Ploufragan, France

^b Université européenne de Bretagne, Rennes, France

^c Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM), UPRES-EA 1026, Polytech'Lille/IUTA, Université Lille Nord de France, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

^d ANSES, Fougères Laboratory, La Haute Marche, Javené, BP 90203, 35302 Fougères Cedex, France

^e ANSES, Lyon Laboratory, 31 avenue Tony Garnier, 69394 Lyon Cedex 07, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2013

Accepted 13 June 2013

Keywords:

Colistin

Escherichia coli

Resistance

Pig

Poultry

ABSTRACT

Colistin is a cyclic decapeptide bound to a fatty acid chain. It is active against many Gram-negative bacteria by destabilising the bacterial outer membrane. Bacteria can become resistant to colistin by modification of their lipopolysaccharide, thereby reducing the affinity of polymyxins. Colistin is often administered orally in poultry and pig production to control colibacillosis. Resistant isolates are sometimes recovered from pathological cases, particularly in piglets. However, in Europe the percentage of resistance to colistin in *Escherichia coli* strains isolated from the digestive tract microbiota of healthy animals remains <1%.

© 2013 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

The polymyxin group of polypeptide antibiotics, discovered in the 1940s, was among the first antibiotics with significant activity against Gram-negative bacteria (GNB). Nephrotoxicity and neurotoxicity were the major side effects and led to the discontinuation of routine use of colistin in humans [1]. More recently, colistin was re-introduced into the therapeutic circuit for the treatment of carbapenem-resistant GNB [2,3].

The structure of polymyxins is composed of a cyclic decapeptide bound to a fatty acid chain. Colistin is a bactericidal drug that binds to lipopolysaccharide (LPS) and phospholipids in the outer cell membrane of GNB. It competitively displaces divalent cations from the phosphate groups of membrane lipids, leading to disruption of the outer cell membrane, leakage of intracellular contents and bacterial death. The role of LPS as a major receptor of polymyxins was proposed and the mode of action was shown to implicate a hydrophobic interaction between the nine-carbon fatty acid side chain of colistin and the fatty acid portion of lipid A [1].

2. Colistin use in animals

In animal health, colistin is used to prevent infections by *Escherichia coli* isolates, which are known to provoke severe adverse effects such as diarrhoea, septicaemia and colibacillosis, mainly in young piglets, and which lead to huge economic losses [4]. In pig farming, colistin is administered with food during or post weaning. Studies on the use of colistin in the animal health sector in France have established that one-third of the exposure of pigs to antibiotics was attributable to polypeptides (colistin) and this rate was even higher for poultry. Investigations carried out on 83 farms in 2008 provided information on the use of antibiotics from the polypeptide group, which includes colistin. In short, this epidemiological study revealed that 93–95% of farms acquired polypeptide antibiotics destined exclusively for oral administration. Moreover, 90% of the farms recognised using colistin during the post-weaning period and 48% used it for maternity and sows, whilst 19% of the polypeptide antibiotics were used for finishing pigs [5]. In Belgium, colistin is the most commonly used antibiotic to treat pigs suffering from conditions such as diarrhoea during the post-weaning period as well as oedema disease due to Shiga toxin-producing *E. coli* [6]. Epidemiological studies carried out in other European countries also observed high colistin use. This was the case in Spain, where investigations carried out by Casal et al. between 2001 and 2003 revealed that colistin was largely used to

* Corresponding author. Tel.: +33 2 96 01 62 81; fax: +33 2 96 01 62 73.

E-mail address: isabelle.kempf@anses.fr (I. Kempf).

treat digestive diseases [7], whilst in Denmark the use of colistin for the treatment of piglets and sows increased between 2003 and 2011 [8]. Finally, in the second European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) report regarding the sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries in 2010, polymyxins accounted for 7% of the sales of premixes expressed as milligram per population correction unit (mg/PCU) (a PCU is a proxy for the size of the animal population) for the 19 countries compared with 55% for tetracycline. For oral solutions, the percentage was 6% [9].

The usually recommended dose for therapy is 100,000 IU/kg body weight [10,11], but in some non-European countries the use of colistin as a feed additive for growth promotion, with lower doses, is authorised [12,13].

3. Mechanisms of resistance to colistin in Enterobacteriaceae

It has been shown that GNB susceptible to polymyxins may switch to a resistant phenotype through modification of their LPS charge. In fact, modification of lipid A of the LPS molecule reduces the negative charges available for interaction with positively charged polymyxins. Modification of lipid A occurs upon linkage of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) to the phosphate group of the lipid A molecule. In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*, synthesis of L-Ara4N from a UDP-glucose precursor requires different enzymes belonging to the polymyxin resistance operon designed *arn* (previously known as the *pmr* operon). Regulation of the synthesis of L-Ara4N is attributed to a two-component system known as PmrA/PmrB and PhoP/PhoQ. Mutations described in *pmrA* of *S. Typhimurium* enabling constitutive expression of the PmrA protein result in resistance to polymyxins and other antimicrobial peptides [1]. In *E. coli*, tyrosine kinase Etk is implicated in phosphorylation of UDP-glucose, and deletion of the *etk* gene provides resistance to polymyxins [1]. In *Yersinia*, other resistance mechanisms involve efflux pumps composed of RosA and RosB proteins [14], and in *Klebsiella* spp. molecules such as polysaccharides present in the bacterial capsule play a key role in protection of this bacterium against polymyxin and other antimicrobial peptides [15].

4. Epidemiology of resistance to colistin

The epidemiology of resistance to colistin is poorly understood and will remain so until interest in this antibiotic once again comes to the forefront in human health. The problem of colistin diffusion in solid-medium agar has been reported [16], and methods based on the determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) are more appropriate [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST); <http://www.srga.org/eucastwt/MICTAB/index.html>]. Moreover, a study showed that resistance in *Salmonella* appeared to be serotype-dependent. *Salmonella enterica* serovar Dublin and *S. enterica* serovar Enteritidis, for example, which belong to the O-group (O:1,9,12), were less susceptible than the other serotypes. The authors suggested that surface LPS of the cell (O-antigen) plays a role in colistin susceptibility and that *Salmonella* MICs should be evaluated at the serovar level [17].

A large-scale investigation of ca. 40,000 human Gram-negative clinical isolates from a worldwide 2006–2009 collection was conducted. The percentages of resistance were 0.2% among more than 15,000 *E. coli* tested and 1.5% among nearly 9000 *Klebsiella* spp. isolates tested. The authors reported that no trend towards increasing resistance to colistin was observed among *E. coli* from distinct geographical regions, but a trend towards greater resistance to

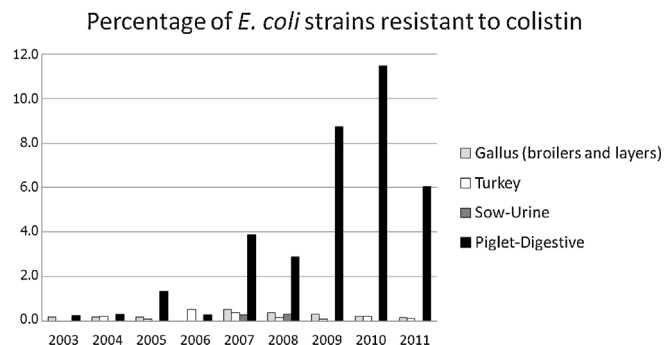


Fig. 1. RESAPATH results: percentage of *Escherichia coli* strains resistant to colistin. Strains were classified as resistant when the inhibition zone diameter around the colistin disk (50 µg) was <15 mm [Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) methodology]. The minimum numbers of tested strains per year are 559 [gallus (broilers and layers)], 940 (turkey), 208 (sow, urinary) and 296 (piglet, digestive tract).

polymyxins was observed among *Klebsiella* spp. isolated from Latin America and the Asia-Pacific region [18]. In Denmark, resistance was detected in *Salmonella* Typhimurium isolates from human cases associated with travel abroad (2.7%; $n = 74$), but not from cases reported as domestic sporadic ($n = 203$), domestic outbreak-related ($n = 21$) or of unknown origin ($n = 85$), and no *S. Typhimurium* isolate obtained from Danish pork ($n = 49$), randomly sampled healthy pigs ($n = 50$) and pigs ($n = 202$) was resistant [8]. However, the publication of Agersø et al. [17] mentions that 0.6% of *S. Typhimurium* isolates from animal/meat origin were non-susceptible to colistin.

The data obtained by various authors for animal isolates are listed in Table 1. In ten different countries from Europe, the rates of resistance of non-wild-type strains observed for *E. coli* isolates from the digestive tracts of healthy animals were estimated to be <1% [26–32]. For strains of *E. coli* from sick pigs and in those with K85 or K88 serotypes, the rate of resistance reached 3% in Croatia [33] and 9.6% in Belgium [34]. A high percentage was also observed in veal calves (5 resistant isolates among 34 strains) in Belgium where colistin is frequently used for group therapy [26]. In South Korea, 10% of *east1*-positive *E. coli* strains from diarrhoeic piglets had a MIC > 4 mg/L [35], whilst in pigs with diarrhoea in Japan and China the percentage of resistant strains was >30% [36,37]. Such high resistance percentages may be related to suboptimal dosages [13,38].

In France, the RESAPATH network (<http://www.resapath.anses.fr/>) is headed by ANSES and has a major task: the monitoring of resistance in pathogenic strains isolated during animal infections. Antibiograms are routinely performed by different veterinary laboratories belonging to the RESAPATH network [39]. The RESAPATH database contains information related to the resistance of strains from pigs and poultry since 2003. Fig. 1 shows the evolution of *E. coli* isolates categorised as resistant strains. Strains are classified as resistant when the diameter of the inhibition zone around the colistin disk (50 µg) is <15 mm [Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) methodology]. It is possible for a few strains with an inhibition zone diameter between 15 mm and 17 mm to have colistin MICs > 2 mg/L [40,41], which means they should therefore be classified as resistant. Thus, the percentage of resistant isolates obtained was most likely underestimated as it did not take into account resistant isolates yielding an inhibition zone diameter between 15 mm and 17 mm, but the bias was identical each year. The percentage of resistance was >8% in 2009 (481 isolates tested) and 2010 (593 isolates tested) for strains isolated from the digestive tracts of diseased piglets, but decreased to 6.1% in 2011 (776 isolates tested). Importantly, <1% of pathogenic strains isolated from sows and poultry, as well as ducks and rabbits

Table 1
Percentage of colistin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* spp.

Country	Animals, strains	Method of analysis/ interpretation	Percentage of non-wild-type or resistance	Reference
France	Faeces from healthy pigs in farms, <i>E. coli</i>	Agar diffusion and MIC if diameter of inhibition zone <14 mm/MIC \geq 4 mg/L	0.5%	[19]
France	Slaughterhouse, pig faeces in 2011, 200 <i>E. coli</i>	MIC/EUCAST ^a	0.5%	M. Bruneau, personal communication
Europe (DK, Fr, GE, NL, ES)	Slaughterhouse, pig faeces, 1543 <i>E. coli</i>	MIC/EUCAST	0.4%	[27]
Europe (Fr, GE, Ir, I, UK)	Slaughterhouse, calf faeces, 1396 <i>E. coli</i>	MIC/EUCAST	<0.1%	[28]
Europe	Slaughterhouse, faeces: Calves, 502 <i>E. coli</i>	MIC/EUCAST	0%	[27]
	Pigs, 520 <i>E. coli</i>		0.2%	
	Poultry, 518 <i>E. coli</i>		0%	
Sweden, 2011 (SVARM)	Poultry, 181 <i>E. coli</i>	MIC/EUCAST	0%	[32]
	Poultry meat, 77 <i>E. coli</i>		0%	
	Pigs, 167 <i>E. coli</i>		0%	
	Pig meat, 77 <i>E. coli</i>		0%	
Sweden, 2010 (SVARM)	Poultry, 181 <i>E. coli</i>	MIC/EUCAST	0%	[31]
	Horses, 272 <i>E. coli</i>		0%	
Denmark (DANMAP, 2011)	<i>S. Typhimurium</i> , human cases (foreigners)	MIC/EUCAST	2/72	[8]
	<i>S. Enteritidis</i> , human case of foreign origin		1/167	
	Pigs, 157 <i>E. coli</i>		0%	
	Calves, 93 <i>E. coli</i>		0%	
	Poultry, 134 <i>E. coli</i>		0%	
	Imported broiler meat, 140 <i>E. coli</i>		3%	
Denmark (DANMAP, 2009)	Pigs, 224 <i>E. coli</i>	MIC/EUCAST	0%	[30]
	Pig meat, 150 <i>E. coli</i>		0%	
	Danish poultry meat		0%	
	Imported poultry meat		4%	
Norway	Pigs, 192 <i>E. coli</i>	MIC/EUCAST	0%	[29]
	Poultry, 208 <i>E. coli</i>		0%	
Belgium	Sick pigs, 157 <i>E. coli</i>	MIC/EUCAST	9.6%	[34]
Belgium ^b	Poultry, 420 <i>E. coli</i>	MIC/EUCAST	0.5%	[26]
	Pigs, 157 <i>E. coli</i>		0.6%	
	Cows, 154 <i>E. coli</i>		0.6%	
	Calves, 34 <i>E. coli</i>		14.7% ^c	
Croatia	Piglets that died following diarrhoea, 114 <i>E. coli</i>	Etest/breakpoint according to CLSI (M31-A3, 2008) ^d	3%	[33]
Germany	Liquid swine manure, <i>E. coli</i>	MIC (DIN 58940-81)/resistance	1.6%	[20]
	Effluents, <i>E. coli</i>	>8 mg/L	0%	
UK	Slaughterhouse: Pigs, 2480 <i>E. coli</i>	Agar diffusion	34.1%	[21]
	Calves, 836 <i>E. coli</i>	BSAC/resistance \leq 14 mm	0%	
	Sheep, 836 <i>E. coli</i>		0.2%	
Canada	Hospital, human medicine, 1732 <i>E. coli</i>	MIC/EUCAST	0.6%	[22]
Japan	Slaughterhouse: Cattle, 356 <i>E. coli</i>	MIC/resistance >1.56 mg/L	3.1%	[23]
	Pigs, 358 <i>E. coli</i>		0.8%	
	Poultry, 304 <i>E. coli</i>		2.3%	
Japan	Sick animals ^e : Cattle, 57 <i>E. coli</i>	MIC/resistance > 2 mg/L	12%	[36]
	Pigs, 118 <i>E. coli</i>		35.6% ^b	
South Korea	Strains isolated from pigs	MIC	MIC ₉₀ = 4 mg/L	[24]
	Strains isolated from pigs after weaning		MIC ₉₀ = 2 mg/L	
China	Faeces: Dairy cattle, 60 <i>E. coli</i>	MIC/CLSI (M31-A3, 2008) ^d	11.7%	[37]
	Pigs, 60 <i>E. coli</i>		33.3%	
	Poultry, 62 <i>E. coli</i>		12.9%	
World	Human clinical isolates, 17 035 <i>E. coli</i> (years 2006–2009)	MIC/EUCAST	0.2%	[18]
Poland	6337 <i>Salmonella</i> (representing 44 serovars) ^f	MIC/EUCAST	14.9%	[25]
	2934 <i>E. coli</i>		1.1%	

MIC, minimum inhibitory concentration; EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute; BSAC, British Society for Antimicrobial Chemotherapy; MIC₉₀, MIC required to inhibit 90% of the isolates; DK, Denmark; Fr, France; GE, Germany; NL, The Netherlands; ES, Spain; Ir, Ireland; I, Italy.

^a EUCAST epidemiological cut-off value for wild-type *E. coli*, \leq 2 mg/L.

^b Resistance to colistin is associated with multidrug resistance.

^c Colistin is frequently used for group therapy in calves.

^d Reference given in the article although there are no polymyxin breakpoints established for Enterobacteriaceae by the CLSI.

^e Among strains from sick pigs: for 61 Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains, >60% resistance; for 57 non-STEC strains, <10% resistance.

^f Depending on the serotype: the percentages were 68% for *S. Dublin*, 48% for *S. Enteritidis* (both belonging to O:9) and 0.5% in *Salmonella* O:8.

that have been subjected to surveillance since 2008, were found to be resistant.

5. Conclusion

Colistin is frequently used as oral medication in pig and poultry production to control colibacillosis. Resistance in *E. coli* is based on mutations responsible for modification of the LPS charge. Strains of *E. coli* with acquired resistance are encountered among pathogenic isolates, particularly in piglets suffering from diarrhoea, but are rare in pathogenic isolates of adult pigs and in other animal species. Careful monitoring of the evolution of this phenomenon is needed but it is reassuring that in France and most European countries the percentage of resistance to colistin in *E. coli* strains isolated from the digestive tract microbiota of healthy animals remains <1%.

Acknowledgment

The authors thank the veterinary diagnostic laboratories involved in the RESAPATH network.

Funding: This study was supported by ANSES and by the Conseil Général des Côtes d'Armor.

Competing interest: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- [1] Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:449–65.
- [2] Lim LM, Ly N, Anderson D, Yang JC, Macander L, Jarkowski A, et al. Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. *Pharmacotherapy* 2010;30:1279–91.
- [3] Yahav D, Farbmán L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:18–29.
- [4] Prescott JF, Baggot DJ. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Boston, MA: Blackwell Scientific Publications; 1988.
- [5] Chauvin C. Étude des acquisitions de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques dans un échantillon d'élevages porcins naisseurs-engraisseurs: année 2008 et comparaison 2008/2005 [Study of the acquisition of veterinary medicinal products containing antibiotics in a sample of pig breeders-fatteners farms: year 2008 and comparison 2008/2005]. ANSES; 2010. <http://www.anses.fr/Documents/LABO-Ra-AntibioEtudPorcin.pdf> [accessed 02.07.13].
- [6] Callens B, Persoons D, Maes D, Laanen M, Postma M, Boyen F, et al. Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Prev Vet Med* 2012;106:53–62.
- [7] Casal J, Mateu E, Mejia W, Martin M. Factors associated with routine mass antimicrobial usage in fattening pig units in a high pig-density area. *Vet Res* 2007;38:481–92.
- [8] Statens Serum Institut. National Veterinary Institute, Technical University of Denmark; National Food Institute, Technical University of Denmark. DANMAP 2011. Web annex. 2012. <http://danmap.org/Downloads/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/DANMAP%202011%20Web%20Annex.ashx> [accessed 02.07.13].
- [9] European Medicines Agency (EMA). Sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries in 2010. Second ESVAC report. EMA; 2012. EMA/88728/2012. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2012/10/WC500133532.pdf [accessed 02.07.13].
- [10] World Health Organization. Evaluation of certain veterinary drug residues in food: sixty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, Switzerland: WHO; 2006. WHO Technical Report Series 939.
- [11] European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Committee for veterinary medicinal products. Colistin. Summary report (2). EMA; 2002. EMA/MRL/815/02-Final.
- [12] Katsunuma Y, Hanazumi M, Fujisaki H, Minato H, Hashimoto Y, Yonemochi C. Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci in the feces of livestock and livestock farmers in Japan. *J Gen Appl Microbiol* 2007;53:273–9.
- [13] Ohya T, Sato S. Effects of dietary antibiotics on intestinal microflora in broiler chickens. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 1983;23:49–60.
- [14] Bengoechea JA, Skurnik M. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Mol Microbiol* 2000;37:67–80.
- [15] Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Alberta S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* 2004;72:7107–14.
- [16] Tan TY, Ng SY. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:541–4.
- [17] Agersø Y, Torpdahl M, Zachariassen C, Seyfarth A, Hammerum AM, Nielsen EM. Tentative colistin epidemiological cut-off value for *Salmonella* spp. *Foodborne Pathog Dis* 2012;9:367–9.
- [18] Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2006–09). *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2070–4.
- [19] Belloc C, Nam Lam D, Laval A. Low occurrence of colistin-resistant *Escherichia coli* in faecal content of pigs in French commercial herds. *Revue de Med Vet* 2008;159:634–7.
- [20] Holzel CS, Schwaiger K, Kuchenhoff H, Kunz A, Meyer K, et al. Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria. *Environ Res* 2010;110:318–26.
- [21] Enne VI, Cassar C, Sprigings K, Woodward MJ, Bennett PM. A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. *FEMS Microbiol Lett* 2008;278:193–9.
- [22] Walkty A, DeCorby M, Nichol K, Karlowicz JA, Hoban DJ, Zhanel GG. In vitro activity of colistin (polymyxin E) against 3,480 isolates of Gram-negative bacilli obtained from patients in Canadian hospitals in the CANWARD study, 2007–2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4924–6.
- [23] Kijima-Tanaka M, Ishihara K, Morioka A, Kojima A, Ohzono T, Ogikubo K, et al. A national surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Japan. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:447–51.
- [24] Byun JW, Kim HY, Jung BY, Bae YC, Lee WK. Antimicrobial resistance and frequency of *bla*_{TEM} in *Escherichia coli* isolated from non-diarrheic and diarrheic piglets. *Korean J Vet Res* 2012;52:133–9.
- [25] Wasyl D, Hoszowski A, Zajac M, Veldman K, Mevius D, Bocian L, et al. Colistin resistance in *Salmonella* and *E. coli*: a statistical approach. In: 3rd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens. Washington, DC: ASM Press; 2012. p. 100–1.
- [26] Callens B, Boyen F, Catry B, Ingenbleek A, Butaye P, Haesebrouck F, et al. Reply to Letter to the Editor by Moore and Elborn (2012) concerning the manuscript "Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds" by B. Callens et al., 2012. *Prev Vet Med* 2012;107:288–90.
- [27] De Jong A, Thomas V, Simjee S, Godinho K, Schiessl B, Klein U, et al. Pan-European monitoring of susceptibility to human-use antimicrobial agents in enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:638–51.
- [28] de Jong A, Thomas V, Simjee S, Valle M, Moyaert H, El Garch F, et al. European antimicrobial susceptibility surveillance in animals: results on enteric bacteria from healthy cattle in the EU. In: 3rd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens. Washington, DC: ASM Press; 2012. p. 100–1.
- [29] NORM/NORM-VET. Usage of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway. 2012. <http://www.vetinst.no/eng/Publications/Norm-Norm-Vet-Report/Norm-NormVet-rapporten-2011> [accessed 02.07.13].
- [30] Statens Serum Institut; Danish Veterinary and Food Administration; Danish Medicines Agency; National Veterinary Institute; Technical University of Denmark; National Food Institute. DANMAP 2009—Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. 2010. <http://www.food.dtu.dk/~media/Institut/Foedevareinstituttet/Publikationer/Pub-2009/DANMAP%202009.ashx> [accessed 02.07.13].
- [31] Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA). SVARM 2010. Swedish veterinary antimicrobial resistance monitoring. SVA; 2011. http://www.sva.se/upload/Redesign2011/Pdf/Om_SVA/publikationer/1/Svarm2010.pdf [accessed 02.07.13].
- [32] Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA). SVARM 2011. Swedish veterinary antimicrobial resistance monitoring. SVA; 2012. http://www.sva.se/upload/Redesign2011/Pdf/Om_SVA/publikationer/Trycksaker/Svarm2011.pdf [accessed 02.07.13].
- [33] Habrun B, Dragica S, Kompes G, Benic M. Antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from weaned pigs in Croatia. *Acta Vet* 2011;61:585–90.
- [34] Boyen F, Vangroenweghe F, Butaye P, De Graef E, Castryck F, Heylen P, et al. Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Vet Microbiol* 2010;144:359–62.
- [35] Han DU, Choi C, Kim J, Cho WS, Chung HK, Ha SK, et al. Anti-microbial susceptibility for *east1+* *Escherichia coli* isolated from diarrheic pigs in Korea. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2002;49:346–8.
- [36] Harada K, Asai T, Kojima A, Oda C, Ishihara K, Takahashi T. Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs in Japan. *J Vet Med Sci* 2005;67:999–1003.
- [37] Lu L, Dai L, Wang Y, Wu C, Chen X, Li L, et al. Characterization of antimicrobial resistance and integrons among *Escherichia coli* isolated from animal farms in Eastern China. *Acta Trop* 2010;113:20–5.
- [38] Guyonnet J, Manco B, Baduel L, Kaltsatos V, Aliabadi MHFS, Lees P. Determination of a dosage regimen of colistin by pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modeling for treatment of G.I.T. disease in pigs. *Res Vet Sci* 2010;88:307–14.

- [39] Sorbe A, Chazel M, Gay E, Haenni M, Madec JY, Hendrikx P. A simplified method of performance indicators development for epidemiological surveillance networks—application to the RESAPATH surveillance network. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2011;59:149–58.
- [40] Jouy E, Meunier D, Kempf I, Ponsin C, Madec JY, Kobisch M. Detection of resistance to colistin in *E. coli* strains isolated from clinical cases in bovines, pigs and poultry—RESAPATH network. In: 7th Congress of the French Society for Microbiology. SFM; 2007.
- [41] Maalej SM, Meziou MR, Rhimi FM, Hammami A. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against Enterobacteriaceae. *Lett Appl Microbiol* 2011;53:546–51.

2.4 Focus sur les C3G et mécanismes de résistance

2.4.1 Les céphalosporines : définition, utilisation chez le porc

Les céphalosporines font partie des β -lactamines. Ces antibiotiques compromettent la formation de la paroi bactérienne en se liant aux enzymes (transpeptidases, appelées aussi Protéines Liant la Pénicilline ou PLP) qui interviennent dans la synthèse du peptidoglycane. Les céphalosporines contiennent un noyau acide 7-aminocéphalosporanique, composé d'un cycle β -lactame essentiel à l'activité, associé à un cycle dihydrothiazine, qui augmente leur résistance aux β -lactamases (figure 15).

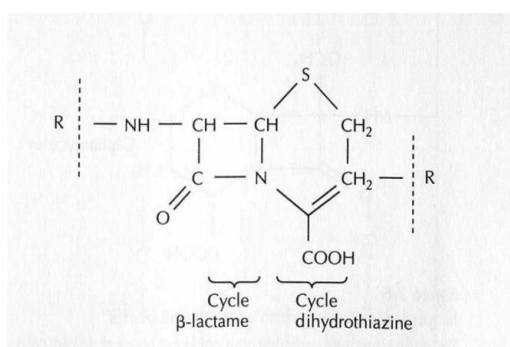


FIGURE 15. Noyau céphème : acide 7-aminocéphalosporanique (7-ACA), (Robert-Dernuet, 1995)

Différentes substitutions au niveau du noyau ont permis d'obtenir une grande variété de molécules (Robert-Dernuet (1995), figure 16).

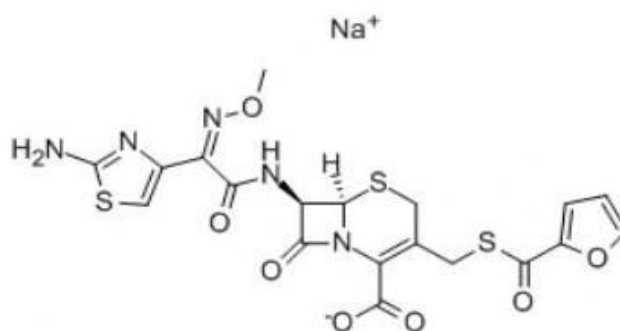


FIGURE 16. Formule du Sodium de ceftiofur (Clearsynth, 2014)

Les céphamycines, comme la cefoxitine, diffèrent des céphalosporines, par la présence d'un cycle methoxy en position 7 et par leur stabilité à de nombreuses β -lactamases. Les céphalosporines sont classées en plusieurs générations en fonction de leur spectre d'activité comme le montre le tableau 9.

TABLEAU 9. Tableau représentant les différentes classes de céphalosporines associées à leur spectre d'action

Classe	Spectre	Exemple en médecine vétérinaire
C1G	surtout Gram + (mais pas <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline) Entérobactéries non productrices de céphalosporinases ou β -lactamases à large spectre (BLSE)	Céfalexine Cefalonium Céfapirine Céfazoline
C2G	Idem C1G, meilleure stabilité vis-à-vis de certaines β -lactamases	
C3G	Extension du spectre vers les entérobactéries mais diminution de l'activité sur les Gram + Résistance vis -à-vis des céphalosporinases et BLSE	Ceftiofur (Exenel ; Naxcel) Céfopérazone
C4G	Bonne activité à la fois sur les Gram + et les Gram - Résistance vis -à-vis des céphalosporinases et BLSE	Cefquinome

Actuellement, les céphalosporines autorisées en France chez le porc sont le ceftiofur (Naxcel, Excenel) pour le traitement des infections bactériennes associées à *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* et *Streptococcus suis*) et le cefquinome (Cobactan) pour le traitement curatif des infections de l'appareil respiratoire à *P. multocida*, *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae* et *S. suis*, le traitement curatif du syndrome mammité-métrite-agalactie (MMA), le traitement des méningites à *S. suis*, le traitement des arthrites à *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *E. coli* et autres germes sensibles au cefquinome et le traitement de l'épidermite (lésions de faible à moyenne importance) à *Staphylococcus hyicus* (Pétit et al., 2014). Le ceftiofur et le cefquinome sont administrés par voie injectable uniquement (sous cutanée ou intra-musculaire selon les formes).

Il est difficile d'évaluer l'usage précis des céphalosporines en production porcine. Compte tenu de leurs caractéristiques attractives (large spectre, temps d'attente réduit, facilité d'administration pour les formes longue-action), les céphalosporines ont bénéficié d'un fort engouement dans les premières années suivant leur mise sur le marché. Selon les chiffres rapportés par le SAGAM (Scientific Advisory Group on Antimicrobials of the committee for Medicinal products for veterinary use), les quantités de céphalosporines utilisées chez le porc en 2005-2006 étaient de 98 et 1310 kg de substance active, au Danemark et en France respectivement, représentant 51% et 89% des quantités totales utilisées chez les animaux de rente à cette époque (Scientific Advisory Group on Antimicrobials of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use and others, 2009). A cette époque, une étude de Jørgensen et al. (2007) rapportait une forte utilisation hors AMM dans la production porcine danoise, qui a été suivie en juillet 2010 par un arrêt volontaire de l'usage des céphalosporines dans la production porcine prononcé par le « Danish Agriculture and Food Council » (Agersø and Aarestrup, 2013).

En France, selon le rapport de l'ANMV (Anses-ANMV, 2014), après une forte augmentation entre 1999 et 2007, l'exposition des porcs aux céphalosporines de dernières générations (C3-C4G) a stagné entre 2007 et 2010, puis a diminué de 65,6% entre 2010 et 2013 (figure 17). En effet, fin 2010, à la suite des alertes exposant l'augmentation rapide de la résistance aux C3-C4G (voir paragraphes suivants), les professionnels de la filière porcine ont volontairement décidé de limiter l'usage de ces antibiotiques et comme le montre la figure 17, cette décision a été largement suivie.

Selon les enquêtes terrain réalisées par l'Anses, l'usage des C3-C4G ne semble pas avoir évolué chez les truies mais la diminution chez les porcs en croissance est considérable. Ainsi 36,5% des porcs en croissance étaient traités aux C3-C4G en 2010, contre seulement 6,4% d'entre eux en 2013. Cette réduction de la consommation de ces molécules d'importance critique pourrait encore s'accroître s'il s'avérait que des mesures restrictives et contraignantes étaient mises en place dans le cadre de la loi d'avenir agricole, comme suggéré dans le plan EcoAntibio2017 : « Arrêt de l'utilisation des céphalosporines de troisième et quatrième génération de manière

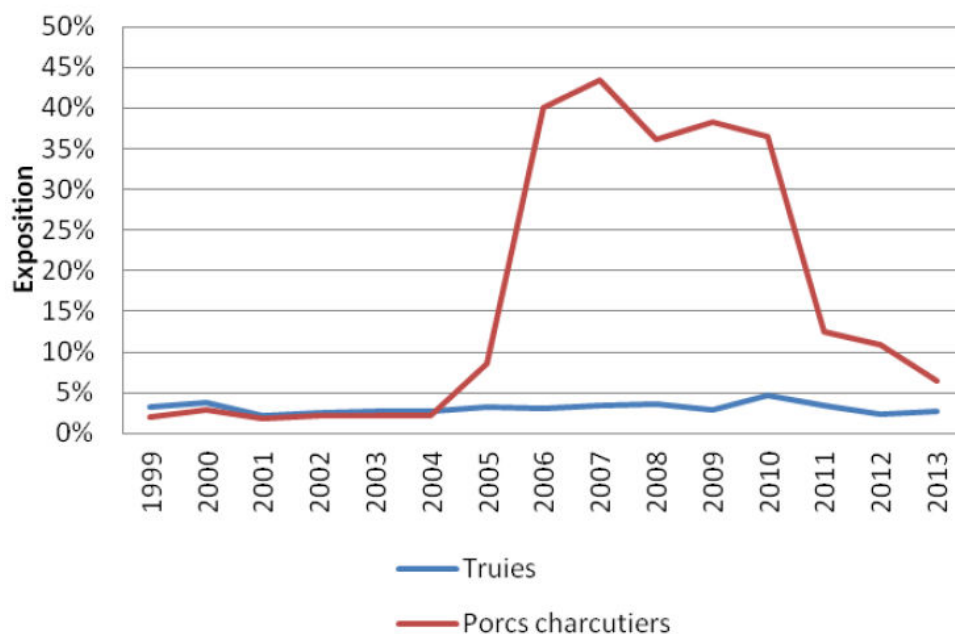


FIGURE 17. Évolution de l'exposition des porcs au ceftiofur (Anses-ANMV, 2014)

préventive à l'occasion des soins des porcelets (caudectomie, castration et époinçage) et utilisation uniquement en seconde intention à titre curatif après identification et démonstration de la sensibilité d'une souche au moyen d'un antibiogramme ». Cette démarche a déjà été initiée par les organisations professionnelles et les organisations techniques vétérinaires de la filière.

Au niveau européen, le rapport ESVAC indique que, en 2012, les ventes de C3-C4G représentent, selon les pays, 0,01% à 1,2% du total des ventes d'antibiotiques, pour toutes espèces animales, exprimées en mg/PCU. Des recommandations, en Europe ou sur les autres continents, soulignent la nécessité de préserver cette classe d'antibiotiques (EFSA, 2011; Wittum, 2012).

2.4.2 Résistance aux céphalosporines : mécanismes, prévalence et facteurs de risque

Les bactéries peuvent résister aux β -lactamines par différents types de mécanismes (Li et al., 2007) : modification des PLP comme chez *S. aureus*, réduction de la concentration intracellulaire de l'antibiotique par augmentation de l'efflux ou réduction de la perméabilité membranaire liée à la perte de porines par exemple, et surtout inactivation de l'antibiotique par des enzymes codées par le chromosome ou par des plasmides. Il existe une très grande variété de β -lactamases (tableau 10), classées en fonction de leur origine bactérienne, de leur substrat préférentiel, ou de leur support génétique.

TABLEAU 10. Tableau représentant les différentes β -lactamases en fonction de leur support génétique et des espèces les produisant (Poirel et al., 2012)

β -lactamase	support	contexte génétique	Espèces	Provenance	Taille en Acides aminés	Nombre de variants ¹
TEM	Plasmidique	"Tn3-like"	Principalement <i>Enterobacteriaceae</i>	Inconnue	286	196
SHV	Plasmidique ou chromosomique	IS26	Principalement <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	286	143
CTX-M	Plasmidique	ISEcp1, IS26, phage	Principalement <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Kluyvera spp.</i>	291	124
GES	Plasmidique ou chromosomique	Intégron, IMU, In125	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	Inconnue	287	20
PER	Plasmidique ou chromosomique	Tn1213, ISCR1, ISPa12	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	Inconnue	308	7
VEB	Plasmidique ou chromosomique	Intégrons, éléments Re ²	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	Inconnue	299	7
BEL	Chromosomique	Intégron In120	<i>P. aeruginosa</i>	Inconnue	283	2
BES-1	Plasmidique pRIO-5	IS26	<i>S. marcescens</i>	Inconnue	292	1
SFO-1	Plasmidique	IS26	<i>E. cloacae</i>	<i>S. fonticola</i>	295	1
TLA-1	Plasmidique	ISCR20	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Inconnue	314	1
TLA-2	Plasmidique pRSB101	Séquences répétées directes de 145-pb	<i>Bactéries non-cultivables</i>	Inconnue	304	1
PME-1	Plasmidique	ISCR24	<i>P. aeruginosa</i>	Inconnue	309	1

¹ En janvier 2012² Re : éléments répétés

Chez les Entérobactéries, des pénicillinases (exemple : TEM, SHV,...) sont fréquemment codées par des gènes situés sur des plasmides conjugatifs, susceptibles d'être transmis d'une souche de *E. coli* vers une autre souche de *E. coli* ou vers d'autres Entérobactéries telles que *Salmonella*. Ces β -lactamases sont capables d'hydrolyser les pénicillines du groupe A (ampicilline, amoxicilline,...) mais sont inhibées par l'acide clavulanique. Plus récemment, des souches capables de résister non seulement aux pénicillines, mais également aux céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} ou 4^{ème} générations ont été mises en évidence chez l'Homme (Poirel et al., 2012), puis dans les différentes filières animales (Meunier et al., 2006). D'abord mises en évidence en France parmi les souches pathogènes, grâce au réseau Résapath (réseau d'épidémiologie-surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes pour l'animal), elles ont ensuite été isolées dans le microbiote digestif des porcs sains arrivant à l'abattoir ou dans leur viande (Anses, 2010). Des mutations dans le promoteur du gène codant pour des céphalosporinases naturelles de *E. coli* peuvent conduire à une synthèse accrue de ces enzymes (phénotype Amp^C), permettant à la bactérie de résister aux pénicillines, aux céphamycines (céfoxitine) et aux céphalosporines (Guillouzouic et al., 2009). Ces enzymes ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. Mais la production de β -Lactamases à Spectre Étendu (BLSE) susceptibles de dégrader les pénicillines et les céphalosporines de première, deuxième (sauf les céphamycines), troisième ou quatrième générations constitue un mécanisme plus inquiétant et plus répandu (Kempf et al., 2014). Cette résistance est très souvent portée par des gènes plasmidiques et présente donc un fort potentiel de diffusion. Par ailleurs, les plasmides comportant un gène de résistance aux céphalosporines à spectre étendu hébergent également fréquemment des gènes de résistance à d'autres antibiotiques (tétracyclines, sulfamides, triméthoprim) conduisant à des phénomènes de co-sélection de souches multi-résistantes : l'utilisation d'un des antibiotiques pour lequel le plasmide porte un gène de résistance contribuera à sélectionner les bactéries porteuses de ce plasmide et donc résistantes à toutes ces familles d'antibiotiques. Différentes publications rapportent les gènes codant pour les BLSE et céphalosporinases identifiés chez les isolats d'origine porcine. En France, comme dans beaucoup de pays, le gène le plus fréquent est le gène *bla*_{CTX-M-1} (Perrin et al., 2011), mais de nombreux autres gènes tels que les gènes de BLSE *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-22}, *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CTX-M-32}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-65}, *bla*_{SHV-5}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{TEM-20}, *bla*_{TEM-52} ou encore les gènes de céphalosporinases plasmidiques *bla*_{CMY-2} et *bla*_{DHA-1} ont été détectés sur des isolats porcins (EFSA, 2011; Agersø and Aarestrup, 2013; Tamang et al., 2013). En 2012, dans le cadre de la surveillance officielle programmée par la Directive 2003/99/EC, le taux de souches de *Salmonella* isolées de porcs résistantes aux C3G atteignait 6,3% en Espagne pour les porcs charcutiers et 11,2% pour les porcs reproducteurs en Belgique (EFSA, 2014) ; pour *E. coli*, le pourcentage moyen des sept pays européens rapportant des résultats était de 1,4%. Ce taux était de 2% pour la France (taux le plus élevé au cours des huit dernières années) et 0,7% pour le Danemark, confirmant pour ce dernier pays la baisse significative de prévalence du portage déjà enregistrée entre 2009 (10,8%) et 2011 (3,6%), suite à l'abandon de l'utilisation des céphalosporines (Agersø and Aarestrup, 2013). Ce portage de souches de *E. coli* ou de *Salmonella* résistantes aux C3G au sein du microbiote digestif entraîne

la présence, heureusement relativement rare, de souches dans les viandes de porcs (EFSA, 2011; Agersø and Aarestrup, 2013), mais aussi, par le biais des effluents contaminés, la dissémination de ces bactéries, plasmides ou gènes dans l'environnement (Rodrigues et al., 2013) ou la contamination des éleveurs (Hammerum et al., 2014; Moodley and Guardabassi, 2009). Par ailleurs, les porcs peuvent aussi héberger des souches résistantes au niveau nasal (Endimiani et al., 2012), ou être infectés par des souches de *E. coli* pathogènes résistantes aux C3G (Schink et al., 2011; Jarrige et al., 2014) susceptibles d'être à l'origine de difficultés thérapeutiques. En France, selon le réseau RESAPATH, le pourcentage de souches de *E. coli* pathogènes non sensibles au ceftiofur est en 2013 de 3% (Jarrige et al., 2014), inférieur au taux de 7% enregistré en 2010, année marquant la réduction massive de l'usage des C3G chez le porc (figure 18).

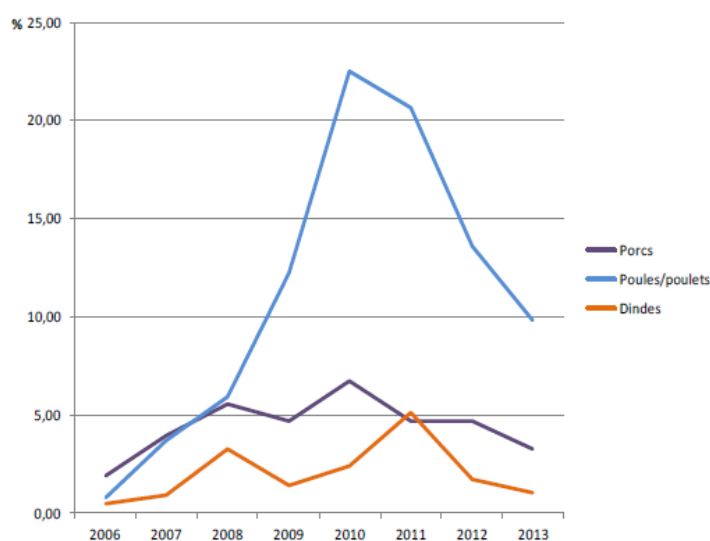


FIGURE 18. Évolution des proportions de souches de *E. coli* non-sensibles au ceftiofur chez les porcs, poules/poulets et dindes (2006-2013)

Différents auteurs ont recherché les facteurs de risque de présence de souches résistantes aux C3G chez le porc. Hansen et al. (2013) ont montré que les porcelets sont infectés très tôt après la naissance, sans doute par l'intermédiaire de la truie, et que le portage semble décroître avec l'âge des animaux. L'impact des traitements antibiotiques est controversé : selon Mollenkopf et al. (2013) aux USA, il n'y aurait pas de lien entre la détection chez des porcs en engraissement de souches porteuses du gène *bla*_{CTX-M} et l'usage des antimicrobiens, y compris l'administration de ceftiofur à titre thérapeutique, alors que selon Agersø et al. (2011), les porcs provenant de fermes utilisant des céphalosporines sont significativement plus souvent porteurs de souches résistantes aux céphalosporines. Pour Lutz et al. (2011), 45% des prélèvements effectués dans des élevages rarement consommateurs de ceftiofur contiennent des *E. coli* résistants aux C3G, cette proportion étant significativement inférieure à celle enregistrée dans des élevages fréquemment utilisateurs de ceftiofur (68%), mais similaire à celle des élevages modérément utilisateurs (73%). De même, la détection de souches de *E. coli* résistants aux C3G est plus fréquente à partir des porcs d'élevages ayant eu auparavant une utilisation fréquente de céphalosporines (79%) comparé aux élevages non utilisateurs (20%) (Hammerum et al., 2014). L'expérimentation de

Cavaco et al. (2008) montre que différentes β -lactamines (amoxicilline, ceftiofur, ou cefquinome) sélectionnent les souches résistantes dans le tube digestif des porcs traités pendant au moins trois semaines après administration. Selon l'étude épidémiologique rapportée par Struve (2011), les taux d'animaux porteurs et les taux de souches résistantes aux C3G sont significativement liés à l'utilisation des antibiotiques, quels qu'ils soient. Mais d'autres antimicrobiens pourraient également modifier le portage de souches résistantes aux C3G : ainsi une moindre résistance aux antibiotiques, y compris aux céphalosporines, serait observée pour les souches isolées de porcs recevant une supplémentation en cuivre (Agga et al., 2014), les auteurs suggérant une forte association négative entre le gène *pco* de résistance au cuivre et les gènes *tetA* (résistance à la tétracycline) et *bla_{CMY-2}* (résistance aux céphalosporines). Certaines pratiques de conduite d'élevage (présence d'une infirmerie pour les animaux malades ou méthode de lutte contre les mouches) sont également des facteurs de risque de présence de souches résistantes aux céphalosporines (Hering et al., 2014). Il est probable que d'autres éléments tels que la compétitivité des souches résistantes (présence sur les mêmes éléments génétiques des gènes de résistance et de gènes bénéfiques pour la bactérie ou absence de coût biologique de la résistance) ou d'autres paramètres liés aux animaux ou à leur microbiote jouent un rôle important dans l'épidémiologie de la résistance.

Chapitre 3

Les modèles coliques *in vitro*

Sommaire

3.1	Les principaux modèles coliques	60
3.1.1	Les systèmes de fermentation « batch »	60
3.1.2	Les systèmes semi-continus et continus	61
3.2	Optimisations de certains systèmes intestinaux susceptibles d'être adaptées dans des modèles coliques	67
3.2.1	Perspectives d'évolution en cours de conception et/ou de validation . .	68
3.2.2	Avantages	68
3.2.3	Limites	69

Qu'il s'agisse du développement ou de l'utilisation de produits, en Nutrition ou en Santé, Animale ou Humaine, et en particulier, pour ce qui concerne l'objet de ce doctorat, du développement et du suivi d'antibiotiques ou d'additifs fonctionnels comme « Alternative aux antibiotiques », le système digestif et le microbiote qui l'habite, apparaissent clairement comme des éléments clefs incontournables pour l'étude et l'analyse du devenir et des effets potentiels de ces produits.

Les conditions de conception, de sélection, de formulation et de libération contrôlée de ces produits dans l'environnement particulier du tractus digestif et leurs interactions avec le microbiote doivent être parfaitement maîtrisées et validées.

Afin de lever un certain nombre de verrous technologiques, les méthodes *in vitro*, pour des raisons réglementaires, budgétaires (Macfarlane and Macfarlane, 2007), de délai et/ou d'éthique (Parliament and the Council of the European Union, 2010; Juin et al., 2014), sont un complément de plus en plus nécessaire à l'expérimentation animale et humaine, comme outils de prédiction *in vivo*, à condition que leur pertinence soit du niveau de celle des expériences *in vivo*.

Le lien entre l'évaluation *in vitro* du devenir dans l'environnement digestif d'un produit de nutrition ou de santé et son suivi *in vivo* est indispensable et nécessite l'établissement de corrélations *vitro/vivo*. Ces dernières sont essentielles pour évaluer l'influence de divers facteurs

sur le devenir d'un produit, optimiser son administration chez l'Homme ou l'animal tout en diminuant les risques. Ainsi, prédiction et corrélations permettent de développer plus rapidement des formes innovantes adaptées à une substance active et à une pathologie.

L'application dans l'Union Européenne de la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) constituant le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale et les diverses pressions de l'opinion publique encouragent depuis plusieurs années le développement de ces méthodes dites « alternatives » à l'expérimentation animale et humaine (Combrisson, 2014).

C'est dans ce contexte qu'ont été développés au monde de nombreux outils *in vitro* de mastication, de dissolution, de digestion, d'absorption et de fermentation, permettant de réaliser des expériences préliminaires en amont de l'expérimentation animale ou humaine, de contourner certaines difficultés techniques ou encore d'apporter des informations complémentaires à des expériences *in vivo* (Tanner et al., 2014a). Seuls, sont reportés dans ce mémoire de doctorat, les principaux modèles simulant la partie colique, objet d'étude de ces travaux, ou encore des systèmes apportant certaines améliorations susceptibles d'être adaptées dans des modèles coliques.

3.1 Les principaux modèles coliques

Des modèles plus ou moins complexes ont été développés et leurs particularités sont présentées dans ce chapitre.

3.1.1 Les systèmes de fermentation « batch »

Les systèmes dits en culture « batch » sont les plus simples. Ce sont des modèles statiques où un substrat est mis en présence d'un inoculum (cultures bactériennes ou suspensions de matières fécales), dans des conditions d'anaérobiose et ce, pendant des durées relativement courtes (durée moyenne de 24 à 48 h) par rapport aux systèmes en flux semi-continu ou continu. Il y a un apport unique de substrat et de solution nutritive en un temps donné, et aucune sortie d'effluents après le démarrage de l'expérimentation. Pendant l'incubation, les conditions de température et d'anaérobiose se rapprochent autant que possible de celles mesurées *in vivo*.

Systèmes simples et non automatisés utilisant de simples cuves permettant de réaliser plusieurs expérimentations en parallèle, ils permettent d'obtenir des résultats sur des temps relativement courts. De nombreux modèles de fermentation de type « batch » ont été mis au point dans le but de mesurer le volume de gaz produit (mesure permettant d'estimer la digestibilité des matières organiques présentes dans les aliments), la production de gaz (méthane chez les ruminants), de déterminer le profil d'AGCC provenant du métabolisme des substrats utilisés par l'écosystème implanté (Kim et al., 2011; Payne et al., 2012) ou encore d'évaluer le devenir de prébiotiques, de probiotiques ou de xénobiotiques dans cet environnement et leur interaction avec les populations implantées dans le système.

Les prélèvements et mesures sont généralement effectués en fin d'incubation ou dans certains cas, à des temps donnés pendant l'incubation, afin d'établir une cinétique de l'évolution des populations composant le microbiote ou une cinétique d'apparition de produits d'intérêt.

Plusieurs limites existent dans ces systèmes et parmi celles-ci, citons, la présence croissante, voire trop importante des produits issus de la fermentation qui peuvent induire des effets délétères, voire toxiques sur le microbiote.

Chez le porc, dans des systèmes « batch », inoculés avec des matières fécales mixées provenant de plusieurs porcs, des études ont permis d'évaluer l'impact de différents produits (amidon de blé et inuline) issus de la fermentation sur la production d'AGCC (Awati et al., 2006). D'autres études de simulation du côlon de porcs ont été effectuées pour lesquelles les milieux nutritifs étaient, soit préparés, soit obtenus à partir d'aliments pré-digérés en présence de pepsine et de pancréatine porcine (Bindelle et al., 2007, 2009; Pieper et al., 2009a; Bindelle et al., 2011) et les suivis réalisés sur 12, 24 ou 72 h. Dans ces études, la faculté de dégradation de polysaccharides par certaines enzymes ou encore l'évolution de la synthèse protéique par les bactéries du microbiote colique en fonction de la source en carbohydrates proposée ont été analysées.

3.1.2 Les systèmes semi-continus et continus

Comparativement aux systèmes « batch », les systèmes semi-continus et continus, inoculés avec un microbiote colique, permettent de réaliser des cinétiques sur un long, voire très long terme (jusqu'à plusieurs mois) et d'obtenir de réels bilans de fermentation.

L'ensemble des modèles de fermentation décrits dans la littérature possède différents niveaux de complexité, allant du simple modèle à un fermenteur à des modèles plus complexes ou jusqu'à trois fermenteurs en parallèle. Les paramètres essentiels tels que le temps de transit colique, le pH, la température, la pression, l'agitation ou encore l'anaérobiose sont maintenus constants et contrôlés au cours du temps. Parallèlement, le potentiel d'oxydo-réduction peut être suivi.

Avec en parallèle une alimentation en milieu nutritif et un retrait des produits de la fermentation, ces systèmes permettent une stabilisation et un bon renouvellement de la population microbienne sur ce long-terme. La différenciation entre modèles semi-continus et continus réside dans la continuité du flux d'alimentation (respectivement discontinu ou continu) en milieu nutritif. En parallèle de cette alimentation, un volume identique de milieu colique fermenté est éliminé par soutirage. Ainsi, le milieu fermentaire ne se trouve jamais épuisé en substrats et les produits de fermentation ne s'accumulent pas dans le système. Un état d'équilibre est obtenu, lequel permet, ensuite, de mieux valider l'effet de différentes substances au cours du temps.

Les principaux modèles semi-continus et continus ainsi que leurs applications possibles pour le porc sont présentés ci-dessous.

3.1.2.1 Le modèle de « Gibson » (Cambridge, Royaume-Uni)

Le développement d'un modèle de fermentation continu multi-étagé par Gibson et al. (1988) a permis de simuler les conditions physico-chimiques et la disponibilité en substrats présents dans les différentes régions du côlon humain. Un milieu nutritif composé de polysaccharides et de protéines a été utilisé pour cultiver artificiellement des bactéries provenant de matières fécales humaines pendant 120 jours. Différents paramètres comme le pH et les productions de gaz et d'AGCC sont suivis au cours de cette expérimentation visant à évaluer l'effet d'un composant (la mucine) sur le microbiote.

3.1.2.2 Le modèle de « Macfarlane » (Cambridge, Royaume-Uni)

Les solutions nutritives utilisées dans la plupart des études de fermentation artificielle sont des adaptations de celle proposée par Macfarlane et al. (1998) simulant la composition nutritionnelle du chyme iléal arrivant au côlon.

Dans ce modèle de Macfarlane et al. (1998), une cuve reproduit le côlon proximal et deux autres le côlon distal (figure 19). Ce modèle permet de simuler *in vitro* les conditions nutritionnelles, physicochimiques, spatiales et temporelles du côlon humain. Ce système a été validé, à partir du modèle de Gibson et al. (1988) pour des études du métabolisme des bactéries du microbiote colique humain.

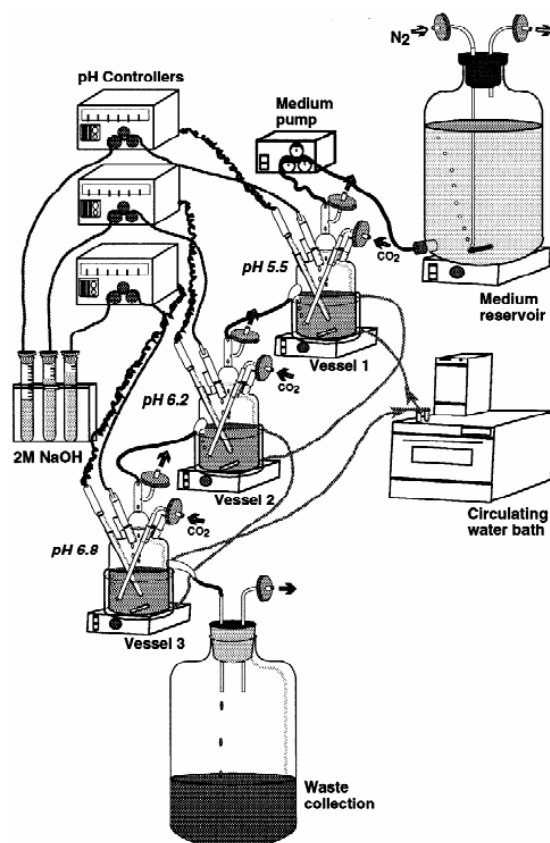


FIGURE 19. Le modèle Macfarlane (Macfarlane et al., 1998)

3.1.2.3 Le système TIM-2 (Zeist, Pays-Bas)

Le système hollandais (Minekus et al., 1995) nommé TIM-2, pour TNO gastroIntestinal Model 2, est un outil complémentaire du système TIM-1, simulant lui l'estomac et l'intestin grêle. Grâce à un pilotage informatisé du système et un contrôle en continu des paramètres essentiels de la fermentation, ce système dynamique et construit sous deux versions, avec un seul compartiment ou multi-compartimenté (3 compartiments : côlons ascendant, transverse et descendant), permet de simuler les conditions présentes dans le côlon, respectivement de manière globale ou dans les trois parties du côlon. Il est très différent des fermenteurs traditionnels. Les principales innovations de ce système (figure 20) reposent sur la simulation d'une part, des mouvements péristaltiques (Havenaar and Minekus, 1998) et d'autre part, de l'absorption passive de l'eau et des produits de la fermentation, via une fibre de dialyse.

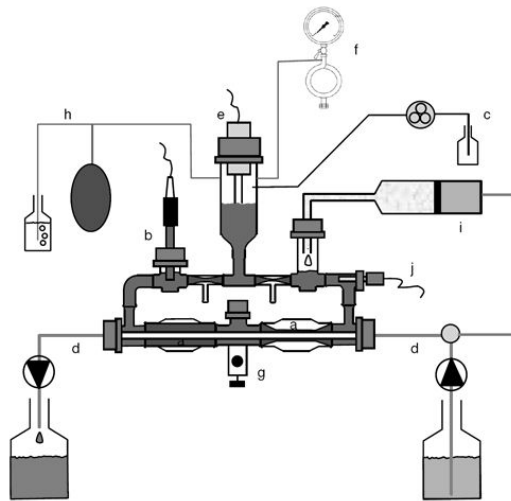


FIGURE 20. Le système TIM-2 (Minekus et al., 1995)

Ce système a été récemment utilisé pour tester l'impact d'une souche probiotique, *Lactobacillus amylovorus*, sur le microbiote colique du porc (Martinez et al., 2013).

3.1.2.4 Le modèle « Cositec » (Giessen, Allemagne)

Le modèle « Cositec » est un système semi-continu qui a été conçu pour simuler l'environnement colique porcin. Le contenu intestinal de porcs est prélevé avant d'être utilisé comme substrat de fermentation. Ce modèle a été utilisé pour évaluer l'impact d'un antibiotique, la clindamycine, sur le microbiote et la production d'AGCC (Stück et al., 1995). Par la suite, il a servi pour évaluer la survie d'une levure probiotique, *Saccharomyces cerevisiae* (Pinloche et al., 2012).

3.1.2.5 Le système colique « ARCOL » (Clermont-Ferrand, France)

Basé sur la technologie des bioréacteurs et le principe de fermentation continue en anaérobiose, un côlon proximal ARCOL, constitué d'une unique cuve réactionnelle où est implantée

une microflore colique, a été mis en place. Anaérobiose, temps de transit, pH, température, pression, potentiel d'oxydo-réduction et également absorption des produits de dégradation via un système de dialyse continue du milieu, sont mesurés et/ou contrôlés (figure 21). Notons que dans ce système, pour la première fois, l'anaérobiose est maintenue par la présence des seuls gaz issus du métabolisme bactérien. Les résultats ont montré qu'il était possible de maintenir une flore pendant 10 jours avec une activité métabolique comparable à celle observée chez l'Homme.

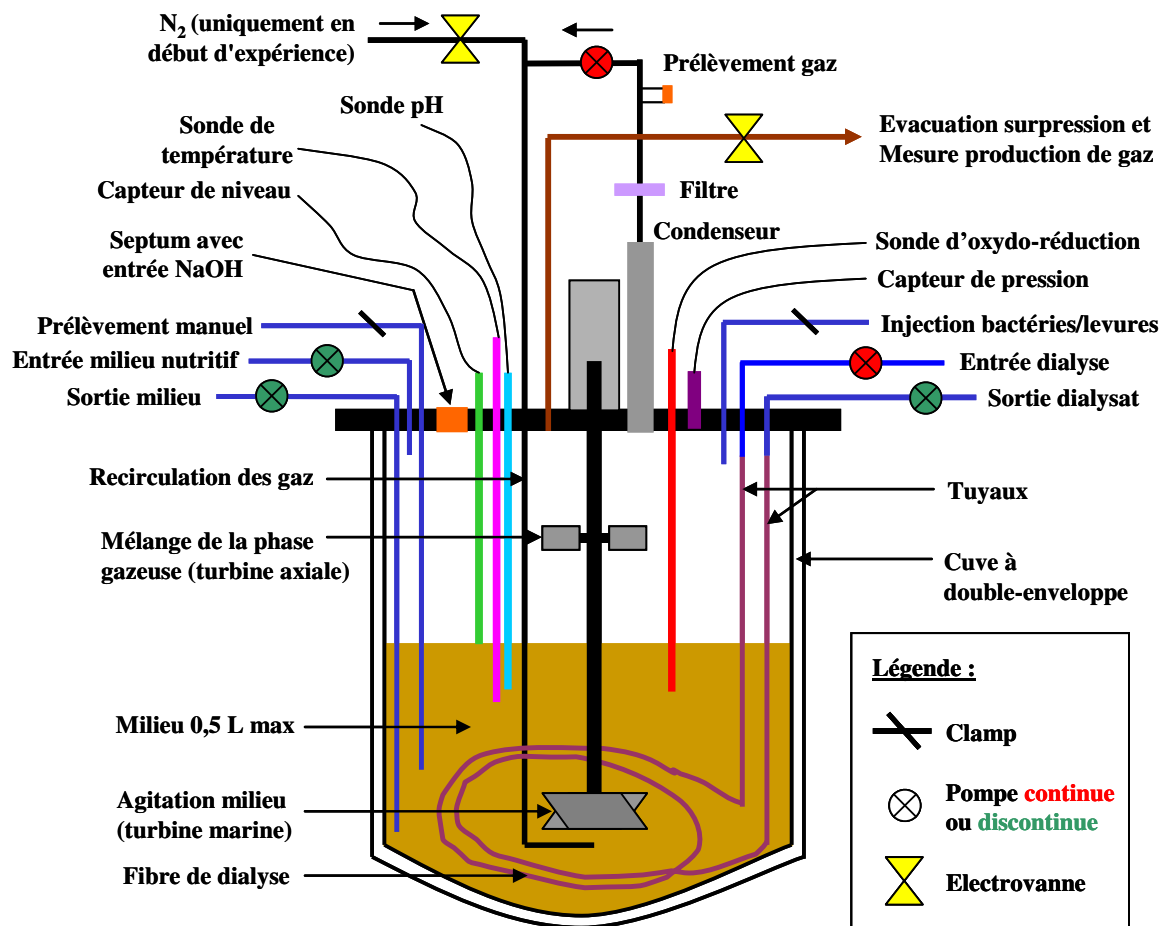


FIGURE 21. Le modèle ARCOL et ses différentes sondes et capteurs (Denis S., communication personnelle)

Ce système a été utilisé par Thévenot et al. (2013) pour étudier les interactions entre bactéries pathogènes (*Escherichia coli* O157 :H7 entérohémorragiques), microbiote et probiotiques.

3.1.2.6 Le système colique « ECSIM » (Clermont-Ferrand, France)

Les limites actuelles des systèmes coliques *in vitro* existants ont été à l'origine de la décision de l'Université d'Auvergne d'engager le développement d'un nouveau système permettant de simuler le plus fidèlement possible le microbiote spécifique des trois parties du côlon (proximale, transversale, distale), dans différentes conditions physiologiques et/ou pathologiques, en

y associant des méthodologies analytiques performantes et novatrices.

Dans des conditions standards d'utilisation (microbiote et milieu de base de référence), trois fermenteurs ont été associés et sont pilotés ensemble.

Dans une première étape, des simulations de côlon proximal « P-ECSIM » (en duplicat ou triplicat par utilisation simultanée respectivement de 2 ou 3 fermenteurs) ont été réalisées en culture continue avec introduction de quelques innovations : culture anaérobie en présence des seuls gaz issus du métabolisme bactérien (mise aussi en place pour le système ARCOL), contrôle continu du potentiel RedOx et des temps de rétention (Feria-Gervasio et al., 2011).

Dans une seconde étape, les trois fermenteurs ont été associés en série de manière à simuler le côlon humain dans sa continuité (figure 22), (d'où le nom de système tri-étagé, 3S-ECSIM), modélisant les parties proximale, transversale et distale du côlon selon leurs propres caractéristiques physicochimiques, en particulier de pH. A l'exclusion du premier fermenteur (alimentation directe par un milieu contrôlé), le contenu microbien de chaque fermenteur et son milieu nutritif proviennent du précédent fermenteur à des rythmes et des volumes modifiables, mimant ainsi le transit intestinal et la part de chaque partie dans le processus de fermentation colique (Feria-Gervasio et al., 2014).

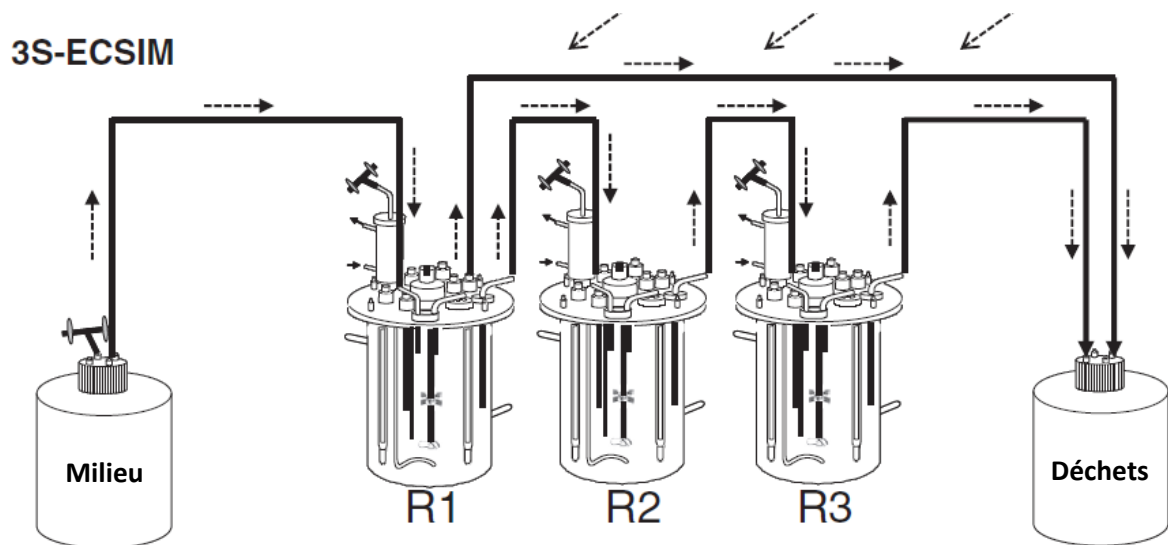


FIGURE 22. Le modèle 3S-ECSIM, représentant les 3 fermenteurs reliés en série (Feria-Gervasio et al., 2014)

Diverses méthodologies (culturelles classiques ou moléculaires) ont été mises en place afin d'optimiser et faciliter l'analyse des contenus microbiens et métaboliques et de suivre leur évolution au cours des expérimentations. L'utilisation du système (simple ou tri-étagé) facilite prise et qualité des échantillonnages, permettant ainsi de réaliser des études cinétiques. Outre les analyses standards du laboratoire (analyse en CPG (Chromatographie en Phase Gazeuse) des gaz H_2 , CO_2 , CH_4 et O_2 , analyse en CPG des AGCC), des profils métaboliques complets

par LC-MS (Chromatographie en phase Liquide - Spectrométrie de Masse, en partenariat avec la Plateforme Métabolisme et Spectrométrie de Masse, INRA Clermont-Ferrand Theix) sont réalisés.

3.1.2.7 Le modèle « Lacroix » (Zurich, Suisse)

Le modèle « Lacroix » a une particularité très spécifique, celle d'utiliser un microbiote immobilisé, essentiellement d'enfants (pour la majorité des travaux), sur des billes de gommagesellane et xanthane (Cinquin et al., 2004). Cette innovation permet de conserver au cours de l'étude, une grande stabilité et diversité du microbiote. Le modèle, placé sous agitation et sous flux de CO_2 , met en jeu de 1 à 5 réacteurs, selon les versions.

Ce système *in vitro* a été adapté pour modéliser l'environnement colique porcin, et en particulier celui du côlon proximal. Nommé « PolyFermS », ce système a été validé sur une durée de 54 jours (Tanner et al., 2014a) pour comparer l'effet de différents traitements appliqués ou non à des fermenteurs recevant un inoculum identique (figure 23). Par la suite, il a été utilisé pour évaluer l'effet synergique d'un probiotique *Bifidobacterium thermophilus* et de prébiotiques sur l'inhibition de la colonisation par *Salmonella* dans le côlon proximal du porc (Tanner et al., 2014b).

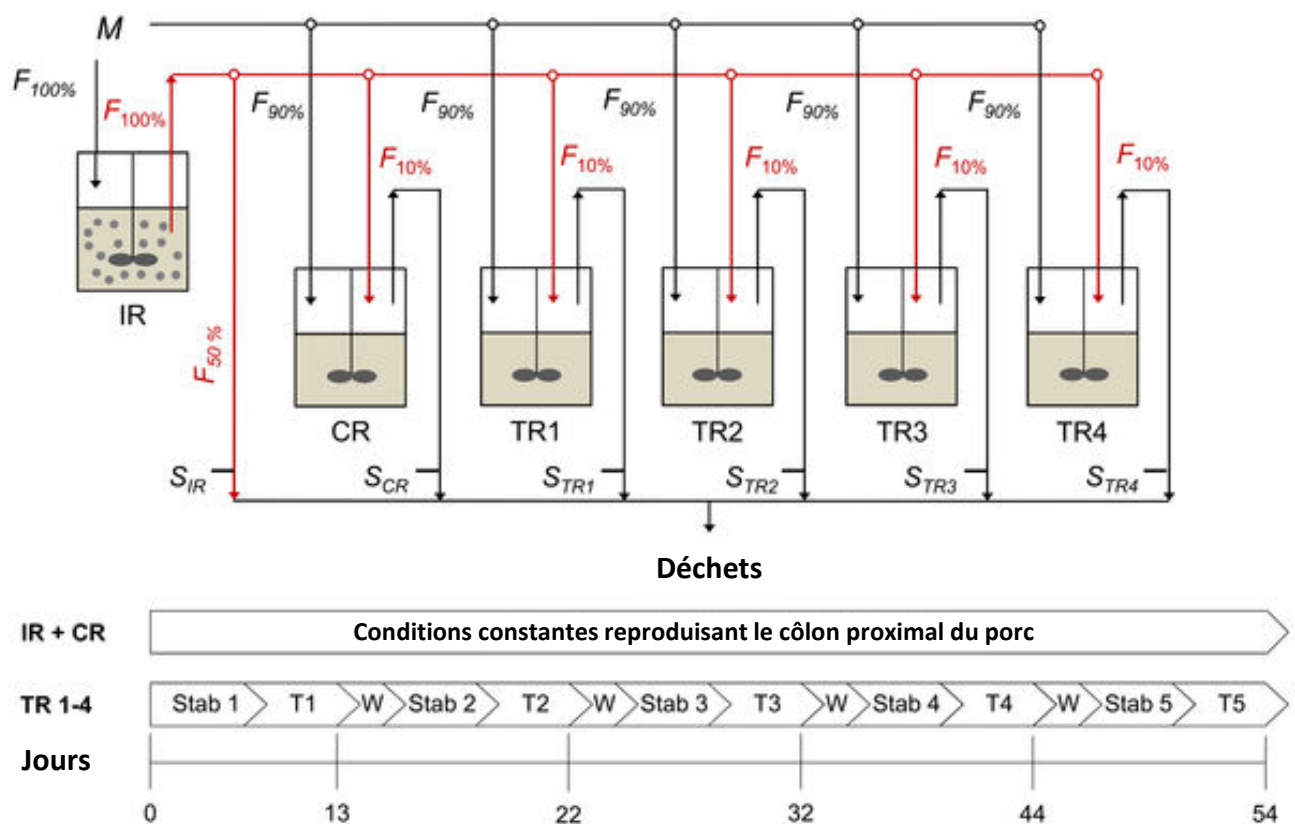


FIGURE 23. Le modèle PolyFermS (Tanner et al., 2014a). Sont représentées les conditions d'utilisation et les différents réacteurs.

3.2 Optimisations de certains systèmes intestinaux susceptibles d'être adaptées dans des modèles coliques

3.2.0.8 Le « M-SHIME » (Ghent, Belgique)

Alors que la majorité des systèmes gastro-intestinaux développés à ce jour ne reproduisent que l'environnement de la lumière intestinale, Van den Abbeele et al. (2012) ont développé un système particulièrement innovant, M-SHIME (pour Mucosal SHIME) en incorporant un environnement mucosal dans le système SHIME précédemment développé dans leur équipe (figure 24). Pour ce faire, des microcosmes couverts de mucine sont introduits dans chacun des bioréacteurs afin de reproduire l'adhésion bactérienne à la couche de mucus de la paroi intestinale. Ceci permettrait ainsi de différencier microbiote luminal et mucosal tels qu'ils sont différenciés *in vivo* (Russell, 1979; Pryde et al., 1999; Simpson et al., 1999).

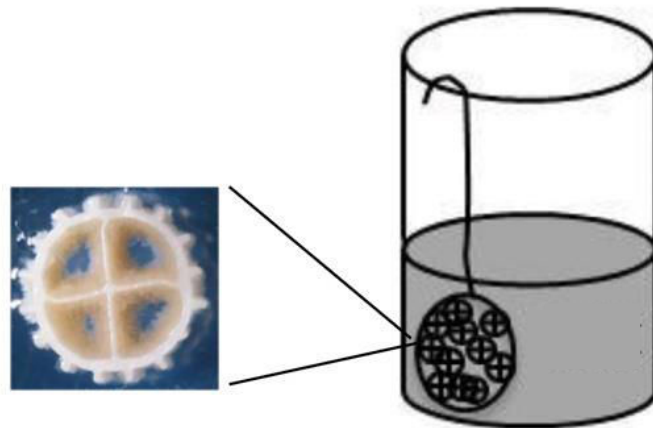


FIGURE 24. Le microcosme du M-SHIME (Van den Abbeele et al., 2012).

3.2.0.9 Le « HMI » (Ghent, Belgique)

Un nouveau module, le HMI (pour Host-Microbiota Interaction), développé par Marzorati et al. (2014) présente deux compartiments séparés par une membrane semi-perméable qui permet de simuler la diffusion de l'oxygène (conditions micro-aérophiles à la base du biofilm) et le transport bi-directionnel des molécules (par exemple, l'absorption des métabolites fermentaires et l'élimination des molécules de défense de l'hôte).

Ce module (figure 25) a permis d'étudier le développement de la flore microbienne associée aux muqueuses en anaérobiose et la culture de cellules eucaryotes jusqu'à 48 h dans le

compartiment aérobie. Ce nouveau module a été testé en combinaison avec le SHIME mais, en tout état de cause, il pourrait également être combiné avec d'autres simulateurs de tractus gastro-intestinal disponibles sur le marché.

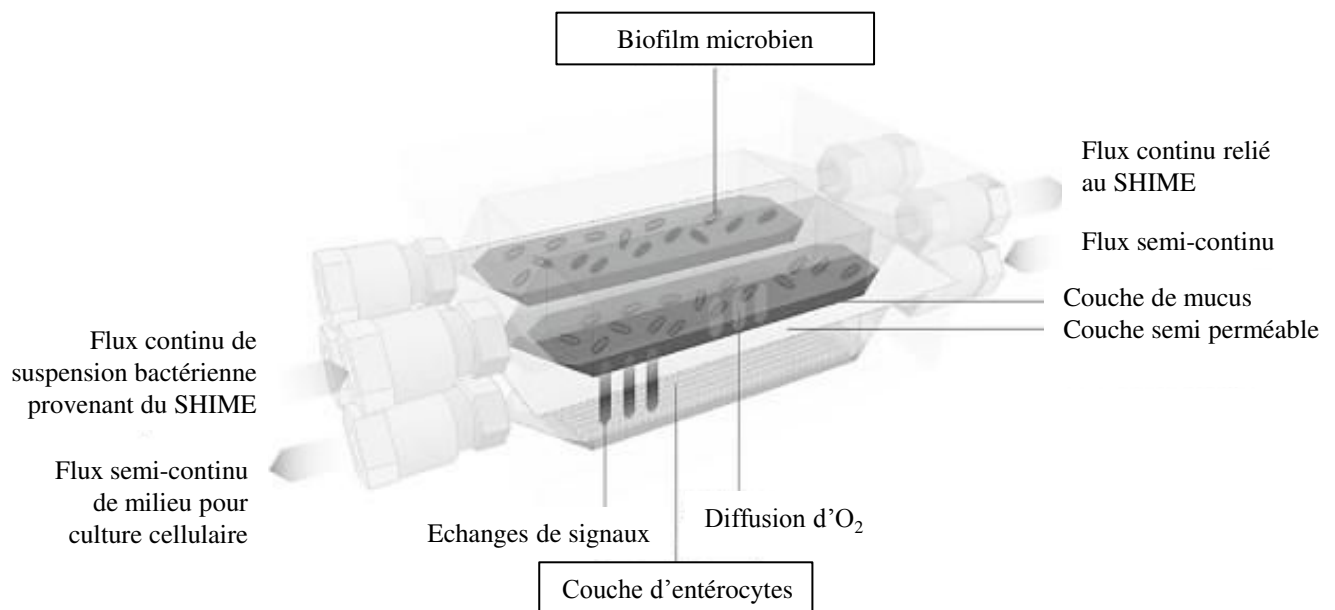


FIGURE 25. Le module HMI (Marzorati et al., 2014). Ce module a été utilisé pour l'étude, sur le long terme, des interactions entre le tractus gastro-intestinal de l'hôte et son microbiote.

3.2.1 Perspectives d'évolution en cours de conception et/ou de validation

Afin de pallier l'une des principales limites des modèles actuels de digestion artificielle qui ne simulent pas l'absorption active des produits de digestion, leur association à des cellules intestinales Caco-2 en culture a été engagée. Des études préliminaires ont permis de définir les conditions expérimentales (culture des cellules, traitement des échantillons) pour le dépôt des digestas sur les cellules intestinales en culture et de résoudre le problème de cytotoxicité de l'aliment et des sécrétions digestives. Puis, le couplage système digestif artificiel/cellules en culture a été validé en suivant l'absorption de deux composés, le lycopène et l'alpha-tocopherol (Déat et al., 2009).

3.2.2 Avantages

Les principaux avantages de la majorité des systèmes *in vitro* (tous systèmes confondus simulant un ou plusieurs compartiments du tractus digestif) incluent :

- la standardisation des protocoles expérimentaux grandement facilitée,

- la possibilité de prélever des échantillons à tout niveau du tractus digestif et de réaliser des études cinétiques du suivi de tout composé,
- l'excellente reproductibilité des expériences,
- la possibilité d'effectuer des études techniquement ou éthiquement impossibles à réaliser chez l'Homme, voire chez l'animal (composés toxiques, pathogènes, radioactifs, ...),
- la conduite d'études de pré-screening à grande échelle dans le cadre du développement de nouveaux produits.

3.2.3 Limites

Hormis certaines limites propres à des systèmes particuliers, les principales limites rencontrées dans la majorité des systèmes *in vitro* concernent :

- l'absence de simulation de l'absorption active des produits issus de la digestion ou de la fermentation,
- l'absence de simulation du mucus dans les différentes parties du tractus (à l'exception du modèle M-SHIME et du module HMI développés par l'équipe belge de l'Université de Ghent)
- l'absence de microbiote dans la partie supérieure du tractus digestif,
- la non intégration de l'ensemble des phénomènes immunologiques, hormonaux et nerveux liés à la régulation de la digestion ou de la fermentation.

De manière générale, tous les facteurs annexes faisant intervenir une régulation provenant de l'hôte lui-même sont difficiles, voire impossibles, à modéliser dans ces systèmes *in vitro* déjà complexes.

Concernant les problématiques animales, l'impossibilité de modéliser la recontamination environnementale ou inter-individuelle entre porcs de la même « bande » est également un frein à l'évaluation spécifique de la transmission de bactéries résistantes aux antibiotiques ou de tout autre contaminant biologique. De même l'effet invasif de certaines bactéries pathogènes ne pourra être évalué.

En résumé, en raison des avantages et des limites exposés ci-dessus pour chacun des systèmes, la sélection du modèle le mieux approprié pour une étude donnée exige, dans une première phase, l'évaluation rigoureuse des objectifs de l'étude à réaliser.

Deuxième partie

Partie expérimentale

Chapitre 1

Traitement antibiotique à la colistine *in vivo*

Sommaire

1.1	Introduction	73
1.2	Article 1	75
1.3	Discussion / Perspectives	104

1.1 Introduction

Le premier essai réalisé sur porcs concerne l'administration de la colistine afin d'évaluer l'impact de cet antibiotique sur le microbiote intestinal. Le choix s'est porté sur la colistine car, chez l'Homme, cet antibiotique est particulièrement utile comme antimicrobien de dernier recours pour certaines infections dues à des bactéries à Gram négatif multi-résistantes telles que *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* (Biswas et al., 2012). Or, son intérêt pourrait être limité par l'apparition de souches résistantes qui pourraient résulter d'un transfert de l'animal à l'Homme. En médecine vétérinaire, la colistine est l'un des antibiotiques les plus fréquemment utilisés en production porcine, en particulier lors des troubles digestifs de la période de post-sevrage. Ainsi en Europe, la colistine est utilisée dans 30% des cas lors de diarrhées porcines (De Briyne et al., 2014). Toutefois, une baisse de l'exposition des animaux à cet antibiotique est actuellement enregistrée en France, avec un indice ALEA, pour les polymyxines (correspondant très majoritairement à la colistine) passant de 0,410 en 2007 à 0,246 en 2013, parallèlement à une très forte diminution de l'administration des prémélanges médicamenteux (Anses-ANMV, 2014). Sur le terrain, les modalités d'utilisation de la colistine sont parfois différentes de celles définies par l'AMM (100 00 UI/kg PV/jour) : ainsi selon Hémonic et al. (2013), pour une raison d'efficacité, les prémélanges à base de colistine ont une posologie prescrite qui est délibérément et couramment augmentée d'un facteur 1,8 alors que selon l'étude de Hutschemaekers et al. (1976), la colistine serait sous-dosée dans 53% des

cas. Compte tenu de ces écarts, nous avons souhaité étudier l'impact de l'administration de la colistine selon des posologies "extrêmes" telles que celles qui sont rencontrées sur le terrain en Europe. Pour cela, la colistine a été administrée, soit par gavage à une dose d'environ 50 000 UI/kg PV/ jour pendant cinq jours, soit sous la forme d'aliment médicamenteux supplémenté avec 3600 UI/gramme d'aliment pendant 14 jours (dose sensiblement équivalente aux doses importantes mentionnées dans l'étude d'Hémonic et al. (2013)). L'objectif était donc d'évaluer l'impact *in vivo* de l'administration de colistine à deux doses différentes sur le microbiote intestinal du porcelet, afin de pouvoir ensuite comparer cet impact à celui observable dans un modèle *in vitro* (c.f. 3, page 59).

Les conditions expérimentales ont été définies et soumises au comité d'éthique en expérimentation animale (ComEth Anses/ENVA/UPEC), afin d'obtenir l'autorisation nécessaire. Nous avons choisi d'utiliser des porcelets issus de nos troupeaux EOPS plutôt que des animaux conventionnels achetés sur le terrain, afin de réduire les risques de contamination par des agents pathogènes bactériens, viraux ou parasitaires, qui auraient pu modifier les conditions expérimentales entre les lots de l'essai. Il nous fallait également tenter d'obtenir, pour les essais successifs *in vivo* puis *in vitro*, des flores les plus identiques possibles. La composition du microbiote et les quantités d'AGCC sur les porcelets EOPS se sont révélées comparables aux données publiées pour des animaux conventionnels (Huijsdens et al., 2002; Loh et al., 2006; Fava et al., 2007; Furet et al., 2009), permettant ainsi de valider le choix du statut sanitaire EOPS des animaux. Différentes contraintes organisationnelles ont dues être prises en compte : la réglementation ne nous autorise pas à produire un aliment médicamenteux, nous avons donc utilisé des aliments commerciaux supplémentés ou non en antibiotiques. Compte tenu des contraintes de laboratoire (volume d'occupation des étuves, durée des manipulations, etc) et des durées de traitement très différentes, il n'a pas non plus été possible de collecter et analyser des prélèvements sur tous les animaux aux mêmes dates. Les jours de prélèvements ont été légèrement décalés. Aussi, il a été décidé dans l'analyse statistique de comparer les périodes avant, pendant et après traitement. Cette analyse a également dû prendre en compte l'évolution du microbiote liée à l'âge ou liée à cette période de post-sevrage.

Pour évaluer l'impact de l'administration de colistine, les analyses réalisées ont visé à caractériser la composition bactérienne du microbiote, son activité métabolique, l'éventuelle sélection de *E. coli* résistants, et, en collaboration avec une équipe hospitalo-universitaire spécialiste de la colistine (W. Couet, Inserm U1070), à mesurer les concentrations de colistine présentes dans le tube digestif. Lorsque ce projet de thèse a été conçu et proposé aux financeurs (Anses, Région Bretagne, SIMV), les méthodes d'analyse du microbiote par séquençage étaient encore très onéreuses et difficiles d'accès, tant pour le séquençage que pour l'analyse bio-informatique. Il a donc été décidé d'analyser les principales populations bactériennes à l'aide d'une méthode de PCR quantitative validée (Saint-Cyr et al., 2014) et déjà utilisée dans différents contextes (Furet et al., 2009; Saint-Cyr et al., 2013). Ces analyses par qPCR ont été complétées, pour le lot recevant la colistine à faible dose, par le dénombrement par culture de certains grands

groupes bactériens (Bactéries anaérobies totales sur milieu BHI (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), Bifidobactéries sur milieu de Beerens (Beerens, 1991), Lactobacilles sur milieu LAMVAB (Hartemink et al., 1997) et Entérocoques sur milieu Cocosel (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Les résultats de ces cultures sont exposés après l'article présenté ci-dessous.

1.2 Article 1

IMPACT OF COLISTIN ON PIGLET GUT MICROBIOTA

M. A. Fleury^{a,b,f}, E. Jouy^{a,b}, F. Eono^{a,b}, R. Cariolet^{a,b}, W. Couet^{c,d,e}, P. Gobin^e, O. Le Goff^f, S. Blanquet-Diot^f, M. Alric^f, I. Kempf^{a,b}

^aANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Ploufragan, France.

^bUniversité Européenne de Bretagne, France.

^cInserm U1070, Pôle Biologie Santé, Poitiers, France

^dUniversité de Poitiers, UFR Médecine-Pharmacie, Poitiers, France.

^eCHU Poitiers, Service de Toxicologie-Pharmacocinétique, Poitiers, France.

^fClermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, EA 4678 CIDAM, Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, BP10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

Corresponding author: Isabelle Kempf, ANSES, Laboratoire de Ploufragan, Unité Mycoplasmodologie Bactériologie, 22440 Ploufragan, France

Phone: +33 2 96 01 62 81

Fax: +33 2 96 01 62 73

Email: isabelle.kempf@anses.fr

Abstract

Colistin is often used in piglets but underdosage and overdosage are frequent. The impact of such administrations on pig fecal microbiota and resistance to colistin was studied. Piglets were given either underdoses or overdoses of colistin (respectively oral gavage at 50 000 IU/kg of body weight for five days or in-feed colistin medication at a dose of 3600 IU/gram of feed for 14 days), representing two frequent situations of poor compliance with recommended dosages. The composition of the fecal microbiota was studied by quantitative PCR and culture of *Escherichia coli* and its activity was followed by quantification of short-chain fatty acids (SCFA). The susceptibility of *E. coli* isolates to colistin was tested and colistin concentration in the feces was measured. The main perturbation of the microbiota was the significant decrease of the *E. coli* population during the treatment period, as detected in the underdosed group by culture and in the overdosed group by culture and quantitative PCR. After the treatment period, the *E. coli* population in both groups rapidly returned to its initial level. All the *E. coli* isolates were found to be susceptible to colistin. Colistin did not affect the production of SCFA. The mean colistin concentrations during the treatment periods for underdosed and overdosed groups were 14.4 µg/g and 64.9 µg/g of feces respectively. These results show that under- or overdoses of oral colistin treatment do not result in major disturbance of the pig gut microbiota and rarely select for resistance in the dominant *E. coli* population.

Key words: colistin - pig - intestinal microbiota - *E. coli* - resistance

Introduction

During the post-weaning period, piglets are submitted to a number of stress factors such as separation from the sow, mixing of litters, change of feed and infections caused mainly by pathogenic *Escherichia coli* and Rotavirus. Post-weaning diarrhea is one of the most frequently encountered diseases and results in animal suffering and huge economic losses. To control *E. coli* diarrhea, antimicrobials are often administered to the piglets. Colistin, belonging to the polymyxin family, is the most frequently used, as reported in several European studies (Callens et al., 2012; Casal et al., 2007). Colistin is a cationic agent which binds to the anionic bacterial outer membrane, leading to the disruption of bacterial integrity. It is active against most *E. coli* isolates, in addition to *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. (Landman et al., 2008). There is very little or no absorption of colistin from the gastro-intestinal tract of young pigs (Guyonnet et al., 2010). The dosage recommended by the summary of product characteristics (SmPC) for the treatment of gastro-intestinal infections is 100 000 IU/kg of body weight (BW)/day for five days. However, in the field, colistin is often supplied as in-feed medication, with an incorporation dose of 3 600 IU/gram of feed, resulting -depending on the feed intake of animals- in a much higher dose of up to 170 000-200 000 IU/kg BW/day for 14 days. Inversely underdosage is also frequent in case of individual oral gavage (Hemonc et al., 2013).

In human medicine, nephrotoxicity and neurotoxicity have led to the discontinuation of the routine use of colistin, but the emergence of multiresistant Gram negative bacteria has given rise to a renewed interest in the therapeutic properties of colistin (Landman et al., 2008). It should be noted that in humans, colistin is mainly administered intravenously or by nebulization as colistin methanesulfonate (CMS), a negatively charged prodrug with no antimicrobial activity. The oral administration of colistin sulfate for selective decontamination

of the digestive tract in immunocompromised patients is limited to few countries and rather controversial because of the risk of resistance selection (Halaby et al., 2013).

It is now feared that the use of colistin in animals might select colistin-resistant bacteria which could then spread to humans and although there are not enough data to support this fear, the European Medicines Agency (EMA) has recently recommended using colistin " for treatment (cure or metaphylaxis) of disease, and not for prophylactic use" (European-Medicines-Agency, 2013). Moreover, as other antimicrobials, the use of this bactericidal agent may lead to significant perturbation of the pig gut microbiota (Looft et al., 2012). The purpose of our study was thus to evaluate, through an experimental assay, the impact of a low dose (underdosage) or the field dosage (overdosage) of colistin on the composition and fermentative activity of the fecal microbiota of pigs and on the resistance of intestinal *E. coli*.

Materials and methods

Animals, housing and experimental treatment

The experiment was conducted at ANSES Ploufragan, North-West France. Three independent air-filtered rooms were used to accommodate 24 Large-White piglets (8-week-old piglets weighing 16.2 ± 1.9 kg on average at the beginning of the experiment) derived from the ANSES Ploufragan specific pathogen-free (SPF) herd. The animals were weaned four weeks before the experiment. The piglets were randomly assigned to three groups, taking into account litter origin, weight and sex: eight non-treated (NT) pigs in room 1; eight pigs in room 2 receiving colistin (Colivet solution, 2 000000 IU /mL, CEVA, Libourne, France) by oral gavage at a low dosage (50 000 IU/kg of body weight from Day 1 (D1) to D5 (colistin low dose group (CL)) and eight pigs in room 3 receiving an in-feed colistin medication (Concentrat VO 49-2 Colistine 200 SOGEVAL, Laval, France) at a dose of 3600 IU/gram of feed (colistin high dose group (CH)). The commercial medicated feed was given *ad libitum*

from day D1 to D14, and the same non-supplemented commercial feed was offered to the other two animal groups. In each room, the pigs were housed in two pens on flat decks. Daily clinical examinations consisted of recording clinical signs and rectal temperatures. Individual body weight was also recorded each week during the experiment and feed intake was measured in each pen. The experiment was terminated four weeks after the beginning of the treatment by euthanasia by intravenous injection of sodium pentobarbital followed by exsanguination and necropsy of four animals from each group, the remaining pigs being raised until slaughter. The experiment was performed in accordance with French animal welfare regulations and the protocol was approved by the ComEth ANSES/ENVA/UPEC ethical committee (authorization 14/02/12-3).

Sampling

Fecal samples were collected from each pig two or three times a week. Because all the animals could not be sampled on the same day, pigs in the NT group were sampled on D2, D10, D15 and D24; those in the CL group on D0, D2, D4, D7, D11 and D18 and those in the CH group on D0, D3, D9, D14, D18 and D22. Samples were immediately placed in generators for anaerobic bacteria (GENbag anaer, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) and stored at -70°C until analysis.

Bacteriological examinations

For each individual fecal sample, ten-fold dilutions were prepared and 100 µL inoculated on McConkey agar medium (Oxoid, Basingstoke, England) to enumerate presumptive *E. coli* (red/pink colonies surrounded by hazy medium). As far as possible, one randomly chosen typical *E. coli* colony per pig and per day was restreaked on Mueller Hinton medium (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and stored for further analysis. After identification by PCR (Furet et al., 2009), a standardized inoculum of each *E. coli* isolate was deposited on Mueller Hinton agar containing colistin sulfate (2 mg/L, Sigma, Saint-Quentin Fallavier,

France) according to the CLSI method (CLSI, 2008) for determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC). According to the EUCAST epidemiological cut-off (<http://mic.eucast.org>), the isolates with an MIC of colistin higher than 2 mg/L were classified as resistant.

Bacterial quantification by real-time PCR

DNA extracts were prepared from 0.2 g of individual fecal samples using the previously described protocol (Yu and Morrison, 2004) followed by Qiagen's DNA stool kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The same protocol was used to prepare DNA from bacterial cultures. DNA extracts were stored at -20°C until analysis. Each DNA extract was quantified using the Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) and was then adjusted to a concentration of 10 ng/μL.

Previously validated quantitative PCR (qPCR) analyses (Saint-Cyr et al., 2014), all targeting 16S rRNA gene fragments (Furet et al., 2009; Saint-Cyr et al., 2013), were carried out to assess changes in the abundance of the total bacterial population and of major bacterial groups characterizing the swine gut microbiota: *Bacteroides* / *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *E. coli*, *Enterococcus* and *Lactobacillus* / *Leuconostoc* / *Pediococcus* according to previously published methods (Table 1). Briefly, PCR reactions were performed in a 10 μl final volume, containing 1 μl of diluted DNA sample, 0.2 μM of each primer, 0.25 μM of TaqMan® probe and 1X of IQ Supermix (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) or IQ SYBR-Green (Bio-Rad). The *E. coli* qPCR used a concentration of 0.3 μM of each primer and 0.1 μM of probe. The amplification program was composed of an initial denaturation of 95°C for 10 min., 40 cycles of 95°C for 30s and 60°C for 60s, and a final melting-curve for SYBR -Green tests. For each sample and each bacterial group, results were expressed in log₁₀ copies of 16S rRNA genes per g of fecal material.

Colistin assay

A robust and sensitive HPLC-MS/MS assay previously developed and validated for the routine analysis of colistin in biological samples was adapted and optimized for colistin quantification in fecal samples. Colistin adsorption on vials and tubing may be quite extensive (Li et al., 2003) but can be inhibited by adding surfactants or bovine albumin serum (Jansson et al., 2009). Therefore, 100 μ L of reconstituted fecal samples in H₂O/MeOH 50/50 (v/v), were mixed with 150 μ L of blank human plasma. The mixture was loaded on Oasis HLB Cartridges (Waters, Milford, MA, USA) and washed with H₂O/MeOH 85/15 (v/v). Analytes were then desorbed from cartridges and eluates were collected and evaporated. Residues were dissolved and analyzed by LC-MS/MS. During the validation step, the method proved precise (inter-day CV%: 10.3-2.5) and accurate (bias from spiking experiments 4.6 to -1.8 within the 0.025-10 μ g/ mL range). It was similarly precise (inter-day CV%: 7.9-3.2) and accurate (bias from spiking experiments -0.5 to -2.6 for quality control at 0.1, 1, 7.5 μ g/ mL during routine analysis).

Short-chain fatty acids dosage

Short-chain fatty acids (SCFA), considered fermentation markers, were analyzed by gas chromatography as described previously (Gerard-Champod et al., 2010). Acetic (Ace), propionic (Pro), isobutyric (I-But), butyric (But), isovaleric (I-Val), valeric (Val), caprylic acids (Cap) and heptanoate (Hep) concentrations were quantified for samples collected on D2, D10 and D24 from NT animals, D0, D7 and D18 for CL pigs and D0, D9, D14 and D22 for CH ones. Assays were performed after a deproteinization step with phosphotungstic acid and using 2-ethylbutyric acid as an internal standard.

Statistical methods

Body weight gains in the different groups were compared using a Kruskal-Wallis test. For data concerning quantification of bacterial populations by qPCR or culture, and SCFA, a

non-parametric Mann-Whitney test was performed to ensure that the three groups were similar at the beginning of the experiment on D2 for NT and D0 for CL and CH groups ("before treatment" period). Then, a normalization step ($\Delta\log = (\log(\text{"during" or "after" period}) - \log(\text{"before"}))$) was realized, and the normalized data of the different groups were compared with a non-parametric Mann-Whitney test. Thus, within each group, data concerning bacterial populations or SCFA, for the "during" colistin administration or the "after" colistin administration periods were compared to their respective data obtained on D2 (NT group) or D0 (CL and CH groups). For bacterial populations, the "during" period included samples collected on D2 and D4 for the CL group, and D3, D9 and D14 for the CH group. The "after" period included samples collected on D7, D11 and D18 for the CL group and D18 and D22 for the CH group. For the NT group, "during" included samples collected on D10 and D15 and "after" samples collected on D24. For data on fermentative metabolites, the "before" period included samples collected on D2 (NT group) or D0 (CL and CH groups), the "during" period included samples collected on D10 (NT group), D7 (CL group) or D9 and D14 (CH group) and the "after" period included samples collected on D24 (NT group), D18 (CL group) or D22 (CH group). For all tests, values of $p < 0.05$ were considered statistically significant differences. All analyses were done in R 3.0.0 (R Core Team, 2013) using the stats package.

Results

Clinical impact:

No clinical signs of illness or hyperthermia were detected. All feces had a normal appearance during the medication period but two animals in the CH group—one in each pen—had slight diarrhea from two days to four days after the end of the colistin supplementation period.

There was no significant difference in the mean body weight gains of the three groups during the study period (data not shown). No lesions were detected at necropsy.

Colistin dosages

Considering the body weights, the body weight gains, and the measured supplemented feed consumption during the colistin medicated feed period, the mean colistin dosages in IU/ kg BW could be calculated for each pen of the CH group for three time intervals (D0-D3, D4-D9 and D10-D14) within the supplementation period (Table 2). Mean colistin dosages varied from 189 190 to 235 941 IU/kg/day.

Colistin residues in feces

The mean colistin concentrations detected in the feces are shown in Table 3. During the administration period, individual concentrations varied from 4.7 to 33.6 µg/g in the CL group and from 16.9 to 113.9 µg/g in the CH group.

Composition of the fecal microbiota

On the first sampling day, the composition of the fecal microbiota based on molecular methods was similar for the three groups ($p>0.05$). The mean values for the numbers of 16S rRNA gene copies of all bacteria, *E. coli*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides/ Prevotella*, *Lactobacillus / Leuconostoc / Pediococcus* and *Enterococcus* were respectively in log₁₀ 10.65, 7.64, 7.88, 9.40, 9.65 and 6.80. Culture results showed that pigs of the CL groups had significantly higher numbers of *Enterobacteriaceae* (6.41 log₁₀) compared to NT and CH (5.92 log₁₀ for both groups).

For NT animals (Figure 1), several targeted populations were stable over time (total bacteria, *E. coli* and *Bifidobacterium* according to qPCR, *Enterobacteriaceae* according to culture). A significant decrease ($P<0.05$) in the number of 16S rRNA gene copies of *Enterococcus* could be observed for samples collected on D10 and D15 compared to D2 for NT pigs, whereas an increase was observed during the treatment period in the CL and the CH groups ($p<0.001$).

However after the treatment period, no significant differences for the numbers of 16S rRNA gene copies of *Enterococcus* could be detected between groups. For NT pigs, a significant decrease ($P<0.001$) in the number of 16S rRNA gene copies of *Lactobacillus* / *Leuconostoc* / *Pediococcus* was also observed for both D10-D15 and D24 compared to D2, and this decrease was also seen for the treated groups for the "after" period ($P<0.001$ for each group). The *Bacteroides* population decreased slightly in NT and CH pigs but not in CL animals ($p<0.001$). Importantly, the main findings were the evolution of the number of 16S rRNA gene copies of *E. coli* according to qPCR and of culturable Enterobacteriaceae. During the treatment period, in comparison to the NT group, a significant decrease ($P<0.001$) was observed by culture and molecular methods for the CH group, but only by the culture method for the CL pigs ($p<0.001$). During the colistin administration, the high dose of colistin had a greater effect than the low dose on Enterobacteriaceae analyzed by qPCR ($P<0.001$) and culture ($P<0.001$). After the treatment period, the culturable Enterobacteriaceae populations returned to their initial levels in all groups.

Colistin susceptibility results

As cultures on a MacConkey medium from thawed samples obtained from CH pigs during the treatment period did not yield *E. coli*, only a limited number of *E. coli* isolates was available to determine susceptibility. Thus, a total of 281 isolates obtained from NT animals (62 isolates), CL animals (143 isolates) or CH animals (76 isolates) were identified as *E. coli* by PCR. All the isolates were found to be susceptible to colistin as their MIC was lower or equal to 2 mg/L.

Short-chain fatty acids

The results of gas chromatography showed that, whatever the treatment or the period analyzed, the main SCFA found in feces was acetate (around 95 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of fresh stool), followed by propionate and butyrate (between 26 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of fresh stool and 28 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of

fresh stool). The other SCFA were detected at lower concentrations (below 4 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of fresh stool). Whatever the dose and mode of administration, the addition of colistin did not affect the production of major and minor SCFA (Figure 2).

Discussion

As colistin is frequently used in pig production (EMEA-CVMP, 2012), it is important to evaluate the impact of its use on pig microbiota and particularly on the selection of colistin-resistant isolates. When it is given directly to individual animals, the recommended dose of colistin for piglets is 100 000 IU/kg BW for three to five days, with the medication being given twice a day. However, in the field, catching the animals or administering the antibiotic twice a day may be difficult for the farmers and this difficulty, in addition to underestimating the pig body weight, may result in underdosing. In the study reported by Callens et al (Callens et al., 2012) on prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds, colistin was underdosed in 53% of cases. Inversely, according to field veterinarians and feed suppliers (C. Chauvin, Anses, personal communication), colistin is most often used as in-feed metaphylactic medication with a dosage of 3600 IU/g of feed. This concentration results in huge variations of the dose in IU/kg BW ingested by each animal, depending on its weight, social rank, health and feed intake (Soraci et al., 2014). This is well illustrated in our trial on healthy pigs by the mean pen-calculated consumptions, which varied from a minimum of 189 190 to a maximum of 235 941 IU/kg. It is important to stress that under field conditions, the target animals are ill and their consumption drops, whereas the healthy piglets are very likely to receive an overdose of colistin, such as experienced in our conditions. Considering this poor compliance with recommended doses, and the risk of selecting resistance by non-optimal antibiotic dosages, we decided to evaluate the impact of colistin in two different situations: underdosage and overdosage.

Wild type *E. coli* have an MIC inferior or equal to 2 mg/L when tested in broth medium (Kempf et al., 2013)(<http://mic.eucast.org>), but higher concentrations are probably necessary to obtain a bactericidal concentration in feces because of an anaerobic atmosphere or the binding capacity of feces (Pellet et al., 2006). The different colistin administration methods and dosages resulted in quite different concentrations of colistin in the fecal samples (and most probably in the digestive tract) of the animals, with approximately five-fold differences in colistin concentration between the CL group (15.11 ± 5.42 and 13.66 ± 11.33 μg colistin base/g of feces on D2 and D4 respectively, fecal samples being collected approximately 23 hours after administration) and the CH group (61.41 ± 20.95 , 70.77 ± 32.73 and 62.55 ± 32.73 μg colistin base/g on D3, D9 and D14 respectively). Guyonnet et al. (Guyonnet et al., 2010) reported a mean concentration of 37.2 $\mu\text{g/g}$ for the total gastro-intestinal tract (duodenum to ileum, including gastro-intestinal tract wall and content) 0.5 h after administration of colistin at a dosage of 50 000 IU/kg, followed after two hours by a rapid decline. According to their pharmacokinetic/ pharmacodynamic study, they recommended a colistin dose of 100 000 IU/kg BW per day. In our animals, the *E. coli* bactericidal concentration was probably achieved with the high dose group, as suggested by the disappearance of most culturable *E. coli*. With the low dose group, only a moderate—but significant—decrease was observed in the *E. coli* counts.

Validated quantitative PCR (Fouhy et al., 2012; Saint-Cyr et al., 2013; Saint-Cyr et al., 2014) was used here to evaluate the variations in major bacterial groups. We confirmed that the bacterial composition of the SPF pigs' microbiota was similar to that of farm animals (Furet et al., 2009). qPCR detected significant modifications in the number of gene copies of *Lactobacillus* / *Leuconostoc* / *Pediococcus* in non-treated animals, a phenomenon related to the evolution of pig microbiota during the weeks following weaning (Heo et al., 2009); this decrease in the *Lactobacillus* / *Leuconostoc* / *Pediococcus* populations was also observed in

the other groups after treatment. No negative impact of colistin on bacterial groups other than *Enterobacteriaceae* could be evidenced as observed in human flora-associated mice receiving 3.1 and 31 mg colistin base (or 93,000 IU and 930,000 IU respectively (Nation et al., 2014)) / kg BW per day for three weeks (Joint-FAO/WHO-Expert-Committee-on-food-additives, 2006) and as could be predicted by *in vitro* susceptibility of the studied bacterial populations (Jeong et al., 2009).

Indeed, the main finding was the decrease in the *E. coli* gene copy numbers in the CH group only during the treatment period, after which numbers rose significantly. This modification was corroborated by the huge variations in the culturable population of *Enterobacteriaceae*. In the CH group, after thawing the samples, few or no *E. coli* could be recovered, illustrating a very severe effect of the high dose of colistin on *E. coli* viability. This effect on culturable *E. coli* was less severe but still significant in the CL group. Thus under our conditions, the impact of colistin administration was detected better by culture than by qPCR. This difference may be due to the presence in the microbiota of colistin-treated animals of many dead or non-viable bacteria detected by qPCR but unable to grow on an agar medium. It may also be due to the freezing of the culture samples, which could have decreased the amount of culturable bacteria, particularly for cells previously weakened by the cationic agent. This dramatic effect of colistin on intestinal *E. coli* had already been reported in human flora-associated mice and human volunteers (Joint-FAO/WHO-Expert-Committee-on-food-additives, 2006). It is noteworthy that, as in this last case, rapid recolonization was observed in our animals, with the *E. coli* population returning to at least its initial level after the end of treatment. The recolonizing *E. coli* were probably acquired from rare surviving bacteria in the animal's microbiota or from the animal's environment, i.e. from fecal material deposited before treatment and still contaminating the pen. Under field conditions, it could be feared that the momentary absence of *E. coli* in the digestive tract could lead to a deficit of the colonization

314 barrier leading to recolonization of the animals by pathogenic serotypes of *E. coli* or
315 *Enterobacteriaceae* (da Re et al., 2013).

316 Our results on SCFAs are in accordance with those previously published in pigs. As observed
317 in other *in vivo* studies, in the present work total SCFA was about 150 mM (Fava et al., 2007;
318 Loh et al., 2006) and acetate, propionate and butyrate were the three main SCFAs found in the
319 pig intestinal contents (Fava et al., 2007; Haenen et al., 2013; Loh et al., 2006; Molist Gasa et
320 al., 2010). Whatever the period, colistin treatment had no significant impact on SCFA
321 production, which are main products of microbial fermentation in the intestine. Similar results
322 were reported in anaerobic chemostat systems prepared with human faecal cultures exposed to
323 colistin (Joint-FAO/WHO-Expert-Committee-on-food-additives, 2006) where only modest
324 modifications of the SCFA composition could be observed. Together with the low impact on
325 the main populations of the fecal microbiota (excepted on *Enterobacteriaceae*), these results
326 tend to confirm the idea that colistin treatment did not result in major disturbance of the pig
327 gut microbiota and microbial activity.

328 In order to detect the emergence of colistin-resistant *E. coli*, we first tried to use 0.25 to 8
329 mg/L colistin-supplemented MacConkey medium (data not shown) to recover rare resistant
330 isolates from large numbers of susceptible isolates, but none of these different colistin
331 concentrations could inhibit the growth of colistin-susceptible *E. coli* from fecal samples of
332 non-treated pigs. This failure could result from the presence of bile salts in MacConkey
333 medium, inducing resistance to polymyxin in *E. coli* (Kus et al., 2011). We also hypothesized
334 that fecal residues could have interfered with colistin activity *in vitro*. Therefore, isolation was
335 first performed on non-supplemented MacConkey medium before colistin susceptibility tests.
336 This procedure probably reduced the sensitivity of the search for colistin-resistant *E. coli*. In
337 our study, we did not find any resistant strain. The absence of emerging resistance has also
338 been observed by others for colistin (Joint-FAO/WHO-Expert-Committee-on-food-additives,

2006). This observation might also explain the very low percentage of colistin-resistant *E. coli* in the feces of healthy animals, despite frequent use of colistin for years. However, it must be remembered that the use in certain countries of colistin at very low doses during prolonged periods to boost growth could lead to the emergence of resistance (Kempf et al., 2013). In conclusion, our study revealed that, under our experimental conditions, the use of colistin—whether under- or overdosed, as is frequently the case in the field—resulted in a temporary decrease or even, in certain animals treated with the high dose, a temporary disappearance of the culturable *E. coli* population, whereas no other significant perturbation of the microbiota or of its metabolic activity could be detected. The *E. coli* population then returned to its initial level. Importantly and in accordance with the low prevalence of colistin resistance observed in the intestinal *E. coli* of healthy animals at slaughterhouse (Kempf et al., 2013), no emergence of resistance to colistin could be detected in the dominant *E. coli* population. However because of the renewed interest of colistin against multidrug-resistant Gram-negative bacteria, responsible use of colistin is a priority and careful monitoring of colistin consumption and resistance is needed.

Acknowledgments

This study was supported by the Côtes d’Armor General Council and the Brittany region. We are very grateful to Claire Chauvin, Jean-Marie Guionnet, Solenn Landié, Alan Nicol and Fabrice Ramalingom (Anses).

Conflict of interest statement: None of the authors of this paper has a financial or personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

References

- Callens, B., Persoons, D., Maes, D., Laanen, M., Postma, M., Boyen, F., Haesebrouck, F., Butaye, P., Catry, B., Dewulf, J., 2012. Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Preventive Vet. Medicine* 106, 53-62.
- Casal, J., Mateu, E., Mejia, W., Martin, M., 2007. Factors associated with routine mass antimicrobial usage in fattening pig units in a high pig-density area. *Vet. Res.* 38, 481-492.
- CLSI 2008. M31-A3, Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard - third edition. 3rd ed. CLSI, Wayne, PA.
- da Re, S., Valle, J., Charbonnel, N., Beloin, C., Latour-Lambert, P., Faure, P., Turlin, E., Le Bouguénec, C., Renauld-Mongénie, G., Forestier, C., Ghigo, J.M., 2013. Identification of Commensal *Escherichia coli* Genes Involved in Biofilm Resistance to Pathogen Colonization. *PLoS ONE* 8.
- EMA-CVMP, 2012. The European agency for the evaluation of medicinal products (Committee for veterinary medicinal products)- Colistin, EMA/MRL/815/02-Final.
- European-Medicines-Agency, 2013. Use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health- - Report EMA/755938/2012. 2013.
- http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/07/WC500146813.pdf.
- Fava, F., Makivuokko, H., Siljander-Rasi, H., Putaala, H., Tiihonen, K., Stowell, J., Tuohy, K., Gibson, G., Rautonen, N., 2007. Effect of polydextrose on intestinal microbes and immune functions in pigs. *Br. J. Nutrition* 98, 123-133.

- 388 Fouhy, F., Guinane, C.M., Hussey, S., Wall, R., Ryan, C.A., Dempsey, E.M., Murphy, B.,
 389 Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Cotter, P.D., 2012. High-throughput
 390 sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota
 391 following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrob.*
 392 *Agents Chemother.* 56, 5811-5820.
- 393 Furet, J.P., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., Dore, J.,
 394 Corthier, G., 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal
 395 microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 351-362.
- 396 Gerard-Champod, M., Blanquet-Diot, S., Cardot, J.M., Bravo, D., Alric, M., 2010.
 397 Development and validation of a continuous in vitro system reproducing some biotic
 398 and abiotic factors of the veal calf intestine. *Applied Environmental Microbiol.* 76,
 399 5592-5600.
- 400 Guyonnet, J., Manco, B., Baduel, L., Kaltsatos, V., Aliabadi, M.H.F.S., Lees, P., 2010.
 401 Determination of a dosage regimen of colistin by pharmacokinetic/pharmacodynamic
 402 integration and modeling for treatment of G.I.T. disease in pigs. *Res. Vet. Sci.* 88,
 403 307-314.
- 404 Haenen, D., Zhang, J., Souza da Silva, C., Bosch, G., van der Meer, I.M., van Arkel, J., van
 405 den Borne, J.J., Perez Gutierrez, O., Smidt, H., Kemp, B., Muller, M., Hooiveld, G.J.,
 406 2013. A diet high in resistant starch modulates microbiota composition, SCFA
 407 concentrations, and gene expression in pig intestine. *J. Nutrition* 143, 274-283.
- 408 Halaby, T., Al Naiemi, N., Kluytmans, J., van der Palen, J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.,
 409 2013. Emergence of colistin resistance in Enterobacteriaceae after the introduction of
 410 selective digestive tract decontamination in an intensive care unit. *Antimicrob. Agents*
 411 *Chemother.* 57, 3224-3229.

- 412 Hemonic, A., Chauvin, C., Corrége, I., Guinaudeau, J., Soyer, J., Berthelot, N., Delzescaux,
 413 D., Verliat, F. 2013. Mise au point d'un outil de suivi des usages d'antibiotiques dans
 414 la filière porcine. Étude des quantités utilisées et des modalités d'administration à
 415 partir du panel Inaporc. In: 45e Journées de la Recherche Porcine, Paris 5 et 6 février
 416 2013.
- 417 Heo, J.M., Kim, J.C., Hansen, C.F., Mullan, B.P., Hampson, D.J., Pluske, J.R., 2009. Feeding
 418 a diet with decreased protein content reduces indices of protein fermentation and the
 419 incidence of postweaning diarrhea in weaned pigs challenged with an enterotoxigenic
 420 strain of *Escherichia coli*. *J. Animal Sci.* 87, 2833-2843.
- 421 Jansson, B., Karvanen, M., Cars, O., Plachouras, D., Friberg, L.E., 2009. Quantitative analysis
 422 of colistin A and colistin B in plasma and culture medium using a simple precipitation
 423 step followed by LC/MS/MS. *J. Pharmaceutical Biomed. Analysis* 49, 760-767.
- 424 Jeong, S.H., Song, Y.K., Cho, J.H., 2009. Risk assessment of ciprofloxacin, flavomycin,
 425 olaquinox and colistin sulfate based on microbiological impact on human gut biota.
 426 *Regulatory Toxicol. Pharmacol.* 53, 209-216.
- 427 Joint-FAO/WHO-Expert-Committee-on-food-additives, 2006. Evaluation of certain
 428 veterinary drug residues in food: 66th report of the joint FAO/WHO expert committee
 429 on food additives. WHO technical report series 939.
- 430 Kempf, I., Fleury, M.A., Drider, D., Bruneau, M., Sanders, P., Chauvin, C., Madec, J.Y.,
 431 Jouy, E., 2013. What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in
 432 avian and pig production in Europe? *Internat. J. Antimicrob. Agents* 42, 379-383.
- 433 Kus, J.V., Gebremedhin, A., Dang, V., Tran, S.L., Serbanescu, A., Barnett Foster, D., 2011.
 434 Bile salts induce resistance to polymyxin in enterohemorrhagic *Escherichia coli*
 435 O157:H7. *J. Bacteriol.* 193, 4509-4515.

- 436 Landman, D., Georgescu, C., Martin, D.A., Quale, J., 2008. Polymyxins revisited. Clinical
437 Microbiol. Rev. 21, 449-465.
- 438 Li, J., Milne, R.W., Nation, R.L., Turnidge, J.D., Smeaton, T.C., Coulthard, K., 2003. Use of
439 high-performance liquid chromatography to study the pharmacokinetics of colistin
440 sulfate in rats following intravenous administration. Antimicrob. Agents Chemother.
441 47, 1766-1770.
- 442 Loh, G., Eberhard, M., Brunner, R.M., Hennig, U., Kuhla, S., Kleessen, B., Metges, C.C.,
443 2006. Inulin alters the intestinal microbiota and short-chain fatty acid concentrations
444 in growing pigs regardless of their basal diet. J.Nutrition 136, 1198-1202.
- 445 Looft, T., Johnson, T.A., Allen, H.K., Bayles, D.O., Alt, D.P., Stedtfeld, R.D., Sul, W.J.,
446 Stedtfeld, T.M., Chai, B., Cole, J.R., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M., Stanton, T.B.,
447 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. Proc. Nat. Acad.
448 Sci. USA 109, 1691-1696.
- 449 Molist Gasa, F., Ywazaki, M., Gomez de Segura Ugalde, A., Hermes, R.G., Gasa Gaso, J.,
450 Perez Hernandez, J.F., 2010. Administration of loperamide and addition of wheat bran
451 to the diets of weaner pigs decrease the incidence of diarrhoea and enhance their gut
452 maturation. Br.J. Nutrition 103, 879-885.
- 453 Nation, R.L., Li, J., Cars, O., Couet, W., Dudley, M.N., Kaye, K.S., Mouton, J.W., Paterson,
454 D.L., Tam, V.H., Theuretzbacher, U., Tsuji, B.T., Turnidge, J.D., 2014. Consistent
455 global approach on reporting of colistin doses to promote safe and effective use.
456 Clinical Infectious Dis. 58, 139-141.
- 457 Pellet, T., Gicquel-Bruneau, M., Sanders, P., Laurentie, M., 2006. Comparison of faecal and
458 optimal growth conditions on in vitro pharmacodynamic activity of marbofloxacin
459 against Escherichia coli. Res. Vet. Sci. 80, 324-335.

- 460 Saint-Cyr, M.J., Perrin-Guyomard, A., Houée, P., Rolland, J.G., Laurentie, M., 2013.
461 Evaluation of an oral subchronic exposure of deoxynivalenol on the composition of
462 human gut microbiota in a model of human microbiota-associated rats. PLoS ONE 8.
- 463 Saint-Cyr, M.J., Perrin-Guyomard, A., Houee, P., Vasseur, M.V., Laurentie, M., 2014. Use of
464 accuracy profile procedure to validate a real-time PCR method to quantify bacteria in
465 feces. J. AOAC Internat. 97, 573-579.
- 466 Soraci, A.L., Amanto, F., Tapia, M.O., de la Torre, E., Toutain, P.L., 2014. Exposure
467 variability of fosfomycin administered to pigs in food or water: impact of social rank.
468 Res. Vet. Sci. 96, 153-159.
- 469 Yu, Z., Morrison, M., 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from
470 digesta and fecal samples. BioTechniques 36, 808-812.
- 471
- 472
- 473

Table 1: Sequences of oligonucleotide primers and probes used for bacterial quantification

Table 2: Mean colistin doses for animals receiving colistin in feed (3600 IU/gram of feed) from D1 to D14

Table 3: Colistin concentrations ($\mu\text{g/g}$) in fecal samples of piglets

Figure captions

Figure 1: Evolution of main bacterial populations of the fecal microbiota during (A) or after (B) the treatment period. A normalization step ($\Delta\log = (\log(\text{"during" or "after" period}) - \log(\text{"before"}))$) was realized.

Before: samples collected on D2 (NT group) or D0 (CL and CH groups)

During: samples collected on D10 and D15 (NT group), D2 and D4 (CL group) and D3, D9 and D14 (CH group)

After: samples collected on D24 (NT group), D7, D11 and D18 (CL group) and D18 and D22 (CH group)

For low dosage, colistin was administered by oral gavage (50,000 IU/kg body weight/day) from D1 to D5. For high dosage, colistin was administered via medicated feed, (3600 IU/g of feed corresponding to approximately 200,000 IU/kg body weight /day) from D1 to D14

Bars indicate standard deviations.

Figure 2: Evolution of short-chain fatty acids of the fecal microbiota of non-treated animals and animals receiving colistin at a low or at a high dosage. A normalization step ($\Delta = (\log(\text{"during" or "after" period}) - \log(\text{"before"}))$) was realized.

Before: samples collected on D2 (NT group) or D0 (CL and CH groups)

During: samples collected on D10 (NT group), D7 (CL group) and D9 and D14 (CH group)

After: samples collected on D24 (NT group), D18 (CL group) and D22 (CH group)

500 For low dosage, colistin was administered by oral gavage (50,000 IU/kg body weight/day)
501 from D1 to D5. For high dosage, colistin was administered via medicated feed, (3600 IU/g of
502 feed corresponding to approximately 200,000 IU/kg body weight /day) from D1 to D14.
503 Bars indicate standard deviations.

Table 1: Sequences of oligonucleotide primers and probes used for bacterial quantification

Assay	Primer and probe name ^a	Sequence 5'→3'
All bacteria	F_Bact 1369	CGG TGA ATA CGT TCC CGG
	R_Prok1492	TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T
	P_TM1389F	(6FAM)CTTGTACACACCGCCCGTC(BHQ1)
<i>Bacteroides</i> / <i>Prevotella</i>	F_Bacter 11	CCT WCG ATG GAT AGG GGT T
	R_Bacter 08	CAC GCT ACT TGG CTG GTT CAG
	P_Bac303*	(6FAM)AAGGTCCCCCACATTG(BHQ1)
<i>Bifidobacterium</i>	F_Bifid 09c	CGG GTG AGT AAT GCG TGA CC
	R_Bifid 06	TGA TAG GAC GCG ACC CCA
	P_Bifid	(6FAM)CTCCTGGAAACGGGTG(BHQ1)
<i>E. coli</i>	E. coli-F	CAT GCC GCG TGT ATG AAG AA
	E.coli-R	CGG GTA ACG TCA ATG AGC AAA
	E.coli-S	(6FAM)TAT TAA CTT TAC TCC CTT CCT CCC CGC TGA(BHQ1)
<i>Enterococcus</i>	F_Enterо	CCC TTA TTG TTA GTT GCC ATC ATT
	R_Enterо	ACT CGT TGT ACT TCC CAT TGT
<i>Lactobacillus</i>	F_Lacto 05	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A
<i>/Leuconostoc</i> <i>/Pediococcus</i>	R_Lacto 04	CGC CAC TGG TGT TCY TCC ATA TA

^afrom Furet et al., 2009

Table 2: Mean colistin doses for animals receiving colistin in feed (3600 IU/gram of feed) from D1 to D14

Mean colistin doses (IU/kg body weight / day)			
Period	D0-D3	D4-D9	D10-D14
Pen 1	189 190	221 097	208 963
Pen 2	215 044	235 941	219 581

D: Day

Table 3: Colistin concentrations ($\mu\text{g/g}$) in fecal samples of piglets

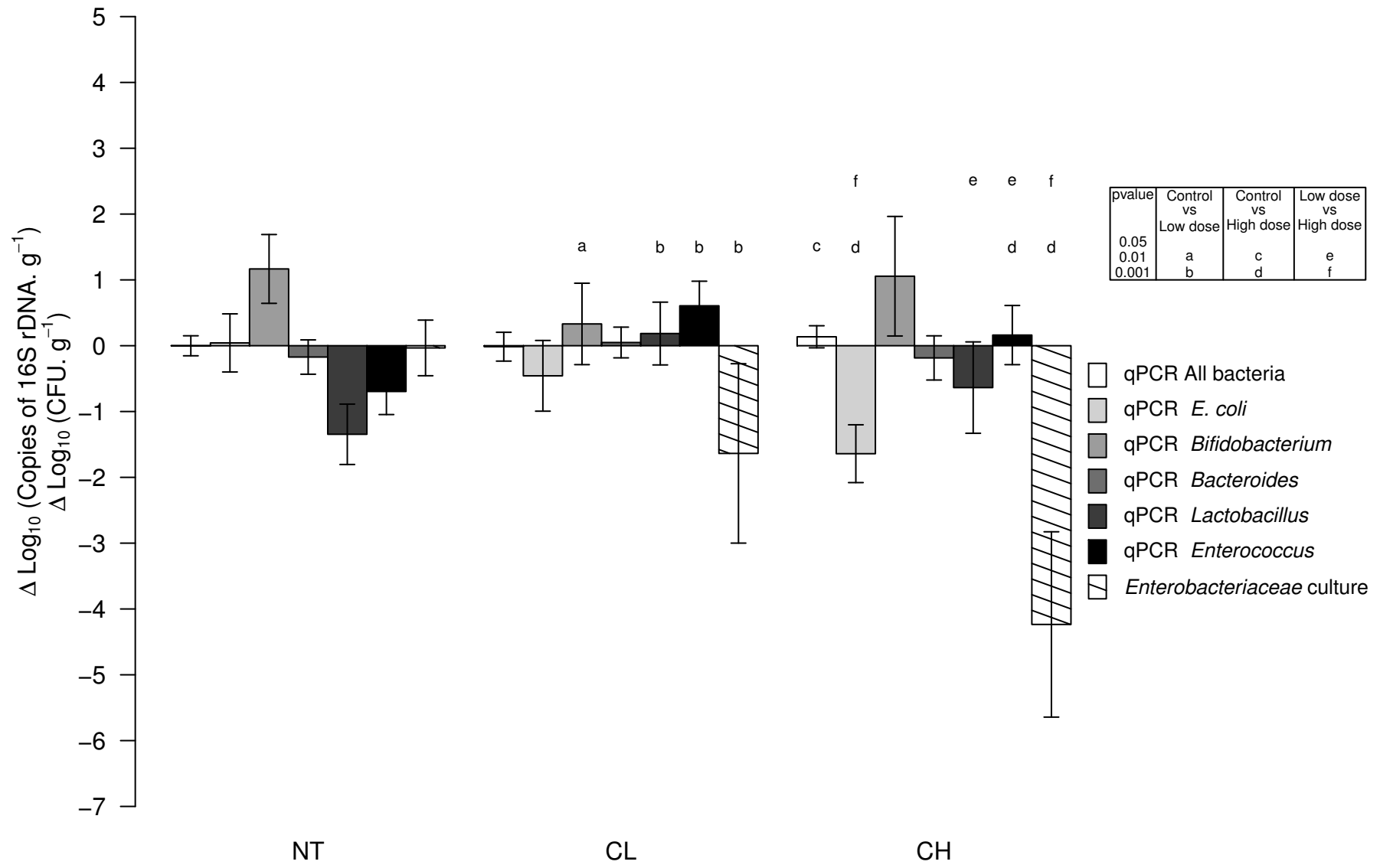
CL group ^a	Day	D2	D4	D7	D9
	Average colistin concentration	15.11 \pm 5.42	13.66 \pm 11.33	1.58 \pm 0.82	2.31 \pm 0.77
CH group ^b	Day	D3	D9	D14	D18
	Average colistin concentration	61.41 \pm 20.95	70.77 \pm 24.95	62.55 \pm 32.73	4.61 \pm 3.40

^aColistin was administered by oral gavage (50 000 IU/kg body weight/day) from D1 to D5;

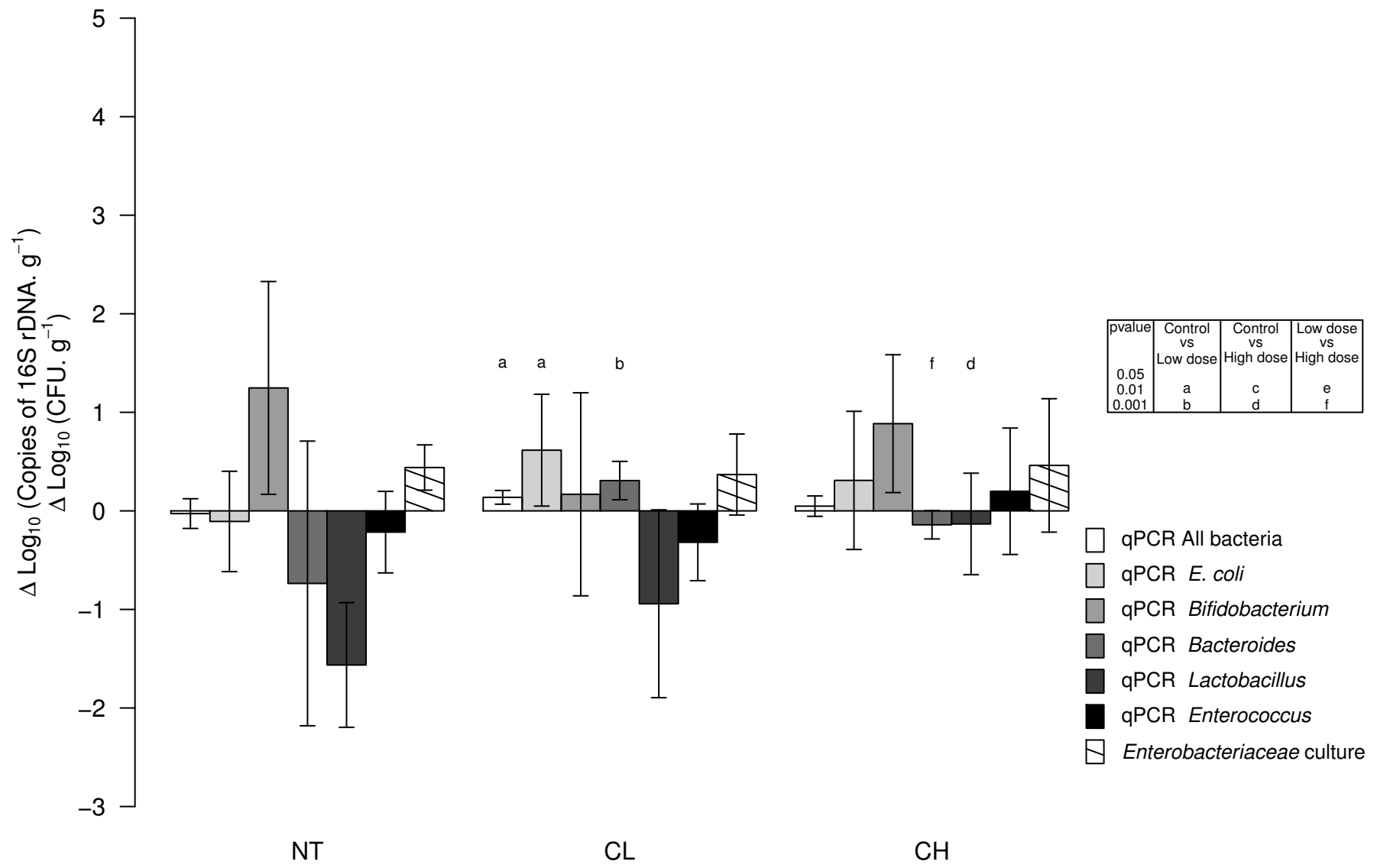
^bColistin was administered via medicated feed, (3600 IU/g of feed corresponding to approximately 200 000 IU/kg body weight /day) from D1 to D14; samples on D14 were collected before removal of medicated feed

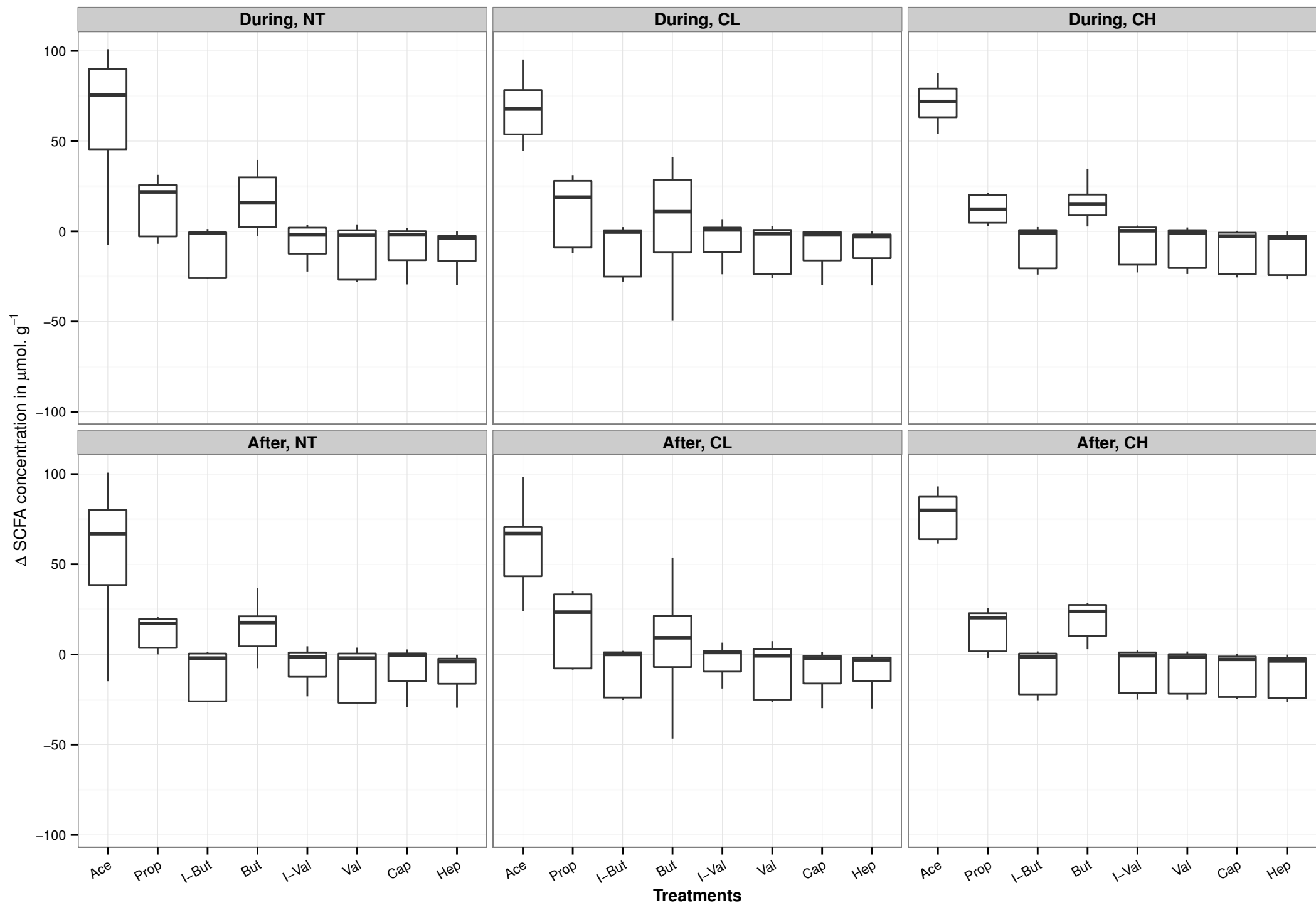
^cEight individual samples were analyzed each day

During



After





1.3 Discussion / Perspectives

Cet article décrit les principaux résultats concernant l'impact de la colistine, administrée selon deux dosages différents, sur le microbiote du porc. Quelques points et des résultats non montrés dans l'article sont exposés et discutés ci-dessous. Ainsi, nous avons pu montrer que la colistine entraîne une diminution -voire une disparition pour la plus forte dose- des *E. coli* cultivables. Toutefois cette décroissance est limitée dans le temps et la population colibacillaire est rapidement restaurée après l'arrêt du traitement. Les résultats de qPCR ne permettent pas de détecter d'autres modifications significatives des principaux groupes bactériens liés à l'administration de colistine. Les résultats de dénombrement des principaux groupes bactériens effectués pour le groupe traité à faible dose (et non présentés dans l'article) sont montrés sur la figure 26 : ils sont globalement en accord avec les données fournies par l'analyse moléculaire par qPCR, à savoir la stabilité des populations de bactéries anaérobies totales, des Bifidobactéries et des Entérocoques et la décroissance significative des Lactobacilles ($p < 0,001$). Pour ce groupe recevant la faible dose de colistine, comme indiqué et discuté dans l'article, seule la culture permet de mettre en évidence une diminution significative des Entérobactéries ($p < 0,001$).

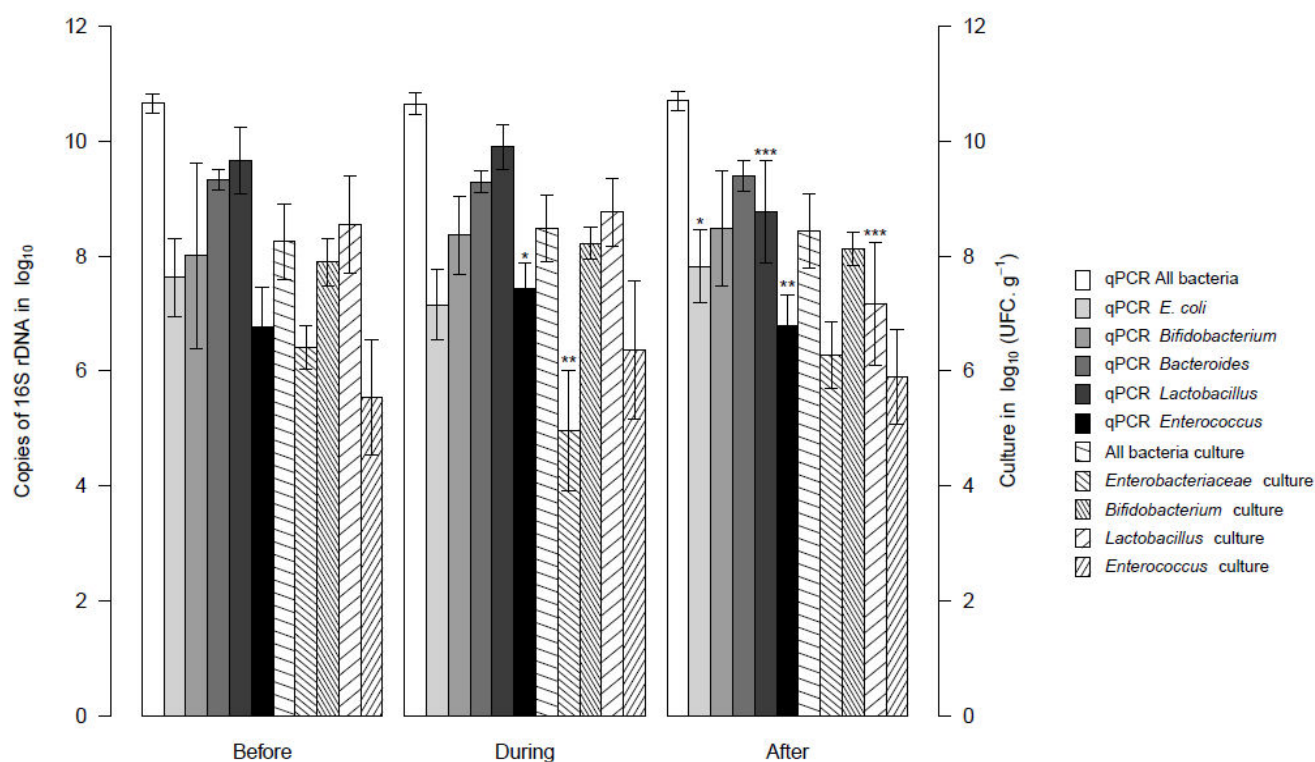


FIGURE 26. Évolution des principales populations bactériennes du microbiote fécal, par qPCR et culture, avant, pendant et après traitement à faible dose

Outre les populations bactériennes déjà prises en compte, il serait intéressant de compléter par exemple par l'étude des genres ou espèces naturellement résistants à la colistine tels que *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* et potentiellement pathogènes. Mais il est évident que les méthodes métagénomiques, basées sur le séquençage total, le séquençage des gènes d'ARNr16S

ou encore la recherche par métagénomique fonctionnelle de gènes de résistance connus ou inconnus devraient fournir beaucoup plus d'informations sans a priori. Certains des échantillons de cette expérimentation seront prochainement analysés par pyroséquençage Illumina.

Le dosage des concentrations de colistine dans les matières fécales a été réalisé par HPLC-MS/MS et indique pour les jours de traitement, selon les lots, des concentrations de l'ordre de 15 ou 65 $\mu\text{g g}^{-1}$ de matières fécales, c'est à dire des concentrations bien supérieures à la valeur seuil de 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ définie par EUCAST (<http://mic.eucast.org/Eucast2/>).

Toutefois, l'effet inhibiteur de la colistine est sans doute fortement réduit du fait de l'adsorption de la molécule aux différents substrats présents dans le tube digestif, et ceci peut expliquer la présence d'Entérobactéries cultivables, au moins chez les animaux recevant la faible dose. Par ailleurs, il n'est malheureusement pas possible, dans nos conditions expérimentales, de connaître les quantités totales de matières fécales produites par les animaux, et de ce fait, nous ne pouvons pas calculer la fraction de colistine éliminée dans les matières fécales, afin de vérifier l'absence d'absorption ou de dégradation de la colistine chez l'animal.

Les résultats ne montrent pas d'émergence de *E. coli* résistants à la colistine dans la population dominante de *E. coli*. Contrairement à d'autres essais concernant d'autres antibiotiques (par exemple l'essai C3G décrit dans le chapitre 2 de cette partie), il n'a pas été possible pour la colistine, de préparer un milieu d'isolement de *E. coli* supplémenté en colistine, ce qui aurait permis de détecter des isolats résistants présents en faibles nombres parmi une population majoritairement sensible. Les milieux MacConkey et TBX supplémentés en colistine (0,25 à 8 mg L^{-1}) n'inhibent pas la croissance des souches de *E. coli* sensibles présentes dans les matières fécales. Plusieurs hypothèses pour expliquer ce phénomène peuvent être avancées, en particulier la présence de sels biliaires dans les milieux de culture, qui pourrait induire la résistance à la colistine (Kus et al., 2011) ou l'inhibition par les matières fécales de l'activité de la colistine *in vitro*. Il faut également souligner le fait que les souches de *E. coli* résistantes à la colistine présentent des concentrations minimales inhibitrices de colistine de l'ordre de 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ou parfois plus) qui sont relativement proches de celles des souches sauvages qui, en majorité ont une CMI de 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Compte tenu des résultats obtenus (absence de détection de souches résistantes dans la population de *E. coli* dominante) et de cette impossibilité de préparer un milieu permettant d'isoler sélectivement les souches résistantes à la colistine, il pourrait maintenant être suggéré, pour un prochain essai, d'inoculer des porcs avec une souche de *E. coli* résistante à la colistine et également porteuse d'une autre résistance chromosomique (rifampicine par exemple). L'analyse des matières fécales pourrait être faite par dénombrement sur milieu supplémenté en rifampicine et estimation du pourcentage de souches également résistantes à la colistine. Un tel protocole permettrait alors, sous réserve de l'implantation de la souche inoculée et de son maintien en faible nombre dans le microbiote des animaux non traités, d'évaluer l'impact des traitements par la colistine sur la sélection ou éventuellement sur la diffusion de la souche inoculée vers d'autres animaux.

D'autres éléments auraient pu être étudiés ou pourront faire l'objet d'études lors de prochaines expérimentations : il serait, par exemple, intéressant de comparer la diversité des souches

de *E. coli* présentes dans le microbiote avant, puis après traitement, pour mieux comprendre l'origine de la recolonisation des animaux. L'émergence de résistances ou d'hétéro-résistances, définie comme la présence de sous-populations résistantes au sein d'une souche sensible, pourrait aussi être explorée au sein d'autres espèces bactériennes telles que *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* ou *Pseudomonas aeruginosa* (Bergen et al., 2011).

Enfin, il est légitime de s'interroger sur l'effet métaphylactique ou curatif de l'administration de colistine vis-à-vis d'une colibacillose. Notre expérimentation montre que, sur des animaux sans signes cliniques, ayant une consommation alimentaire normale, comme dans le cadre d'une métaphylaxie, la colistine administrée à faible ou à forte dose permet de réduire temporairement la population de *E. coli* dans le tube digestif; à l'arrêt du traitement, la recolonisation est rapide, peut-être par des *E. coli* encore présents dans le microbiote du porcelet ou d'origine externe. Il est donc possible que l'animal soit alors colonisé par une ou des souches pathogènes circulant dans l'élevage, mais il est alors plus âgé, donc peut-être plus résistant et la période de stress multiples (séparation de la mère, changement d'aliment, etc) est passée. Dans cette perspective, en complément des nécessaires mesures d'hygiène pour réduire le risque de re-contamination par une souche pathogène, il pourrait être envisagé, lorsque les concentrations intestinales de colistine sont inférieures à la fenêtre de sélection, d'orienter cette colonisation par l'administration de souches de *E. coli* non pathogènes et fortement colonisatrices ou d'autres probiotiques afin de corriger le microbisme de l'élevage. Ceci pourrait être une étape vers des mesures de démedicalisation.

Lors de l'administration de colistine par aliment supplémenté, notre expérimentation ne permet pas d'évaluer l'effet curatif vis-à-vis d'une colibacillose. En effet, les porcs inclus dans l'étude sont en bonne santé et ingèrent une ration normale; des porcelets malades consommeraient moins, et la concentration de colistine dans l'intestin serait inférieure, et peut-être encore réduite du fait de la diarrhée. Par ailleurs, lors de pathologie à *E. coli*, la charge bactérienne est probablement nettement plus importante, ce qui réduit encore le ratio concentration de colistine/population de *E. coli*, et donc vraisemblablement l'effet inhibiteur de l'antimicrobien. De plus, les conditions dans le tube digestif sont perturbées par la maladie (augmentation de la température, transit accéléré, composition du contenu intestinal modifié, etc) et rendent l'évaluation de l'efficacité potentielle encore plus hasardeuse. Toutefois, ces différents éléments (concentrations réduite de colistine, charge microbienne, etc) suggèrent que l'administration aux animaux malades est vraisemblablement plus propice à la sélection de souches résistantes qu'une administration métaphylactique, comme semble le démontrer la prévalence supérieure de la résistance parmi les souches de *E. coli* pathogènes en particulier celles isolées de diarrhées de porcelets en comparaison des souches de portage (Kempf et al., 2013). Des études spécifiques visant à évaluer l'efficacité de la colistine et le risque de sélection de souches résistantes lors de diarrhées colibacillaires, devraient donc être réalisées soit sur le terrain, soit à l'aide d'un modèle expérimental d'infection colibacillaire.

Chapitre 2

Traitement antibiotique par C3G *in vivo*

Sommaire

2.1	Introduction	107
2.2	Article 2	111
2.3	Discussion / Perspectives	146

2.1 Introduction

Ce volet de notre travail concerne l'impact de l'utilisation des céphalosporines sur le microbiote du porc. Afin de réaliser cet essai en conditions expérimentales contrôlées, il était nécessaire dans un premier temps de mettre au point un modèle de colonisation digestive de porcelets EOPS, ce modèle devant être utilisé pour les travaux de cette thèse et d'autres projets du laboratoire. Une fois le modèle développé, nous l'avons utilisé pour analyser l'impact de l'injection de Naxcel (ND), une forme « longue action » du ceftiofur. Cette forme galénique a été sélectionnée afin de comparer son impact à celui de formes classiques de ceftiofur à libération immédiate utilisées dans des études antérieures (Cavaco et al., 2008).

L'impact de l'injection a été évalué en analysant les modifications mesurées par qPCR des grands groupes bactériens et du nombre de copies du gène *bla*_{CTX-M-1}, et les variations des métabolites fermentaires. Les analyses culturales se sont concentrées sur les Entérobactéries, afin de mettre en évidence d'éventuels transferts du gène de résistance *bla*_{CTX-M-1} entre souches. Il était initialement prévu de doser les concentrations de ceftiofur dans les matières fécales des porcelets, mais des difficultés techniques ont empêché ces mesures.

Nous reportons ici brièvement les modalités de préparation de la souche et décrivons l'essai préliminaire d'implantation de cette souche *E. coli* M63 résistante chez des porcelets.

Afin de favoriser l'implantation de la souche de *E. coli* résistante aux C3G (R-C3G) sur les porcs EOPS et de faciliter l'étude des transferts de gènes, une souche *E. coli* isolée de

porcs du troupeau EOPS de l'Anses de Ploufragan a été préparée en la rendant résistante à la rifampicine et porteuse d'un plasmide contenant le gène *bla*_{CTX-M-1}. Pour cela, comme décrit dans l'article ci-après, une souche de *E. coli* sensible aux antibiotiques a été collectée à partir de matières fécales de porcs EOPS. L'identification de la souche a été vérifiée par PCR (Furet et al., 2009) et sa non-appartenance aux pathotypes du porc a été contrôlée par séro-agglutination à l'aide de sérums du commerce (K85, K87, K88, K81, K82 et F6 (987P), Biovac, France). Cette souche a été ensuite rendue résistante à la rifampicine par culture sur milieu supplémenté en rifampicine (250 mg L⁻¹). Le groupe phylogénique de l'isolat a été déterminé par PCR (Clermont et al., 2000). Parallèlement, une souche de *E. coli* R-C3G a été choisie dans la collection disponible au laboratoire. Il s'agit d'une souche obtenue d'un porc sain prélevé à l'abattoir dans le cadre du plan de surveillance de l'antibiorésistance de 2005. L'identification de cette souche a été vérifiée par PCR (Furet et al., 2009) ainsi que la présence du gène *bla*_{CTX-M-1} (Woodford et al., 2006). La souche receveuse et la souche donneuse ont été cultivées ensemble avec de la rifampicine (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France, 250 mg L⁻¹) et du cefotaxime (VWR, Fontenay sous bois, France, 32 mg L⁻¹) dans du bouillon Mueller Hinton. Après 24 heures d'incubation, la culture a été centrifugée. Le culot obtenu a été déposé sur de la gélose Mueller Hinton supplémentée en cefotaxime et en rifampicine. L'identification, la résistance aux deux antibiotiques ainsi que le groupe phylogénique du transconjugant *E. coli* M63 obtenu ont été vérifiés. Très récemment, le plasmide de *E. coli* M63 a été entièrement séquencé.

Pour l'essai d'implantation de la souche *E. coli* M63 sur porcelets, trente porcelets EOPS âgés de 6,5 semaines ont été utilisés et répartis en trois animaleries C2 à C4 (figure 27), chacune contenant deux parcs séparés. La première (C2) contient 10 porcelets, dont six sont inoculés par voie orale avec du milieu stérile.

Disposition des animaux pendant les deux premiers jours

Animalerie C2	Animalerie C3	Animalerie C4
6 porcs témoins	6 porcs inoculés <i>E. coli</i> M63	6 porcs inoculés <i>E. coli</i> M63
4 porcs "contacts"	4 porcs "contacts"	4 porcs "contacts"

Disposition des animaux à partir de 48 heures après la première inoculation

Animalerie C2	Animalerie C3	Animalerie C4
3 porcs témoins + 2 "contacts"	3 porcs inoculés <i>E. coli</i> M63 + 2 porcs "contacts"	3 porcs inoculés <i>E. coli</i> M63 + 2 porcs "contacts"
3 porcs témoins + 1 "contact*"	3 porcs inoculés <i>E. coli</i> M63 + 2 porcs "contacts"	3 porcs inoculés <i>E. coli</i> M63 + 2 porcs "contacts"

*un porcelet est mort accidentellement

FIGURE 27. Disposition des animaux au cours de l'essai

Pour chacune des deux autres animaleries (C3 et C4), les deux premiers jours d'expérimentation, six porcelets disposés dans le parc côté « douche » sont inoculés par voie orale (*E. coli*

M63 : $6,8 \times 10^9$ UFC/porcelet) deux fois à 24 heures d'intervalle. Les parcs côté « visite » de ces deux animaleries contiennent chacun quatre autres porcelets. Quarante huit heures après la première inoculation, pour chacune des animaleries, les animaux sont déplacés de manière à réunir dans chacun des parcs trois porcs inoculés au contact de deux porcelets non inoculés. Les animaux sont observés quotidiennement et des prélèvements de matières fécales sont collectés régulièrement. Les échantillons sont ensemencés sur milieux TBX (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) supplémentés en cefotaxime (1 mg L^{-1}) et rifampicine (200 mg L^{-1}) afin de détecter les *E. coli* résistants aux deux antibiotiques. Pour un des parcs, un dénombrement des *E. coli* doublement résistants est également réalisé par ensemencement de dilutions décimales successives des matières fécales sur le milieu supplémenté. Les animaux sont sacrifiés puis autopsiés après cinq semaines d'observation.

Le protocole de préparation décrit a permis d'obtenir un *E. coli* transconjugant M63, appartenant au groupe phylogénétique B1, négatif vis-à-vis des antisérums spécifiques des principaux sérotypes pathogènes pour le porc. La souche *E. coli* M63 est résistante à la rifampicine, aux C3G, à la streptomycine et au triméthoprim-sulfaméthoxazole. Le séquençage du plasmide indique la présence des gènes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CMY-59}, *sul2*, *aadA5* et *dfrA17*.

L'inoculation de la souche *E. coli* M63 aux porcelets n'entraîne pas de désordres digestifs majeurs. Les jours suivant l'inoculation, des traces de vomissement sont observés sous le parc des porcs inoculés et quelques porcs présentent une légère hyperthermie (inférieure à 41°C , température normale $<40^\circ\text{C}$). Les performances zootechniques (gains de poids) ne sont pas affectées (résultats non montrés). Les autopsies ne permettent pas de relever de lésions imputables à l'inoculation ou à la diffusion de la souche *E. coli* M63. Les résultats des isollements sur milieux doublement supplémentés montrent que les animaux non inoculés n'hébergent pas de souche de *E. coli* résistante aux deux antibiotiques (rifampicine et C3G) ; inversement, tous les animaux inoculés excrètent, à un niveau élevé (environ 10^7 UFC/gramme de matière fécale) des *E. coli* résistants aux deux antibiotiques dès le lendemain de la première inoculation. Puis, à partir du troisième jour, et jusqu'au dernier prélèvement effectué après 21 jours, le niveau d'excrétion se stabilise aux environs de 10^5 UFC/gramme. Dès le troisième jour après la première inoculation, soit dès 24 heures après la mise en contact étroit (dans les mêmes parcs) des porcelets inoculés et des porcelets non inoculés, tous les porcs « contacts » sont également excréteurs de *E. coli* résistants. Par la suite, tous les porcs des deux animaleries sont excréteurs à toutes les dates, mis à part deux animaux « contacts » à deux dates différentes. Les titres moyens des porcs du parc suivi (C3 côté « douche ») sont présentés sur la figure 28.

Bien qu'aucune analyse supplémentaire n'ait été effectuée, il est raisonnable de penser que les souches isolées sur le milieu avec C3G et rifampicine correspondent à la souche *E. coli* M63. La recherche d'autres Entérobactéries ayant acquis la résistance n'a pas non plus été entreprise au cours de cet essai, mais a été réalisée dans l'essai qui a suivi et qui fait l'objet d'un des paragraphes de l'article. Toutefois, au vu de ces résultats, l'essai permet de valider

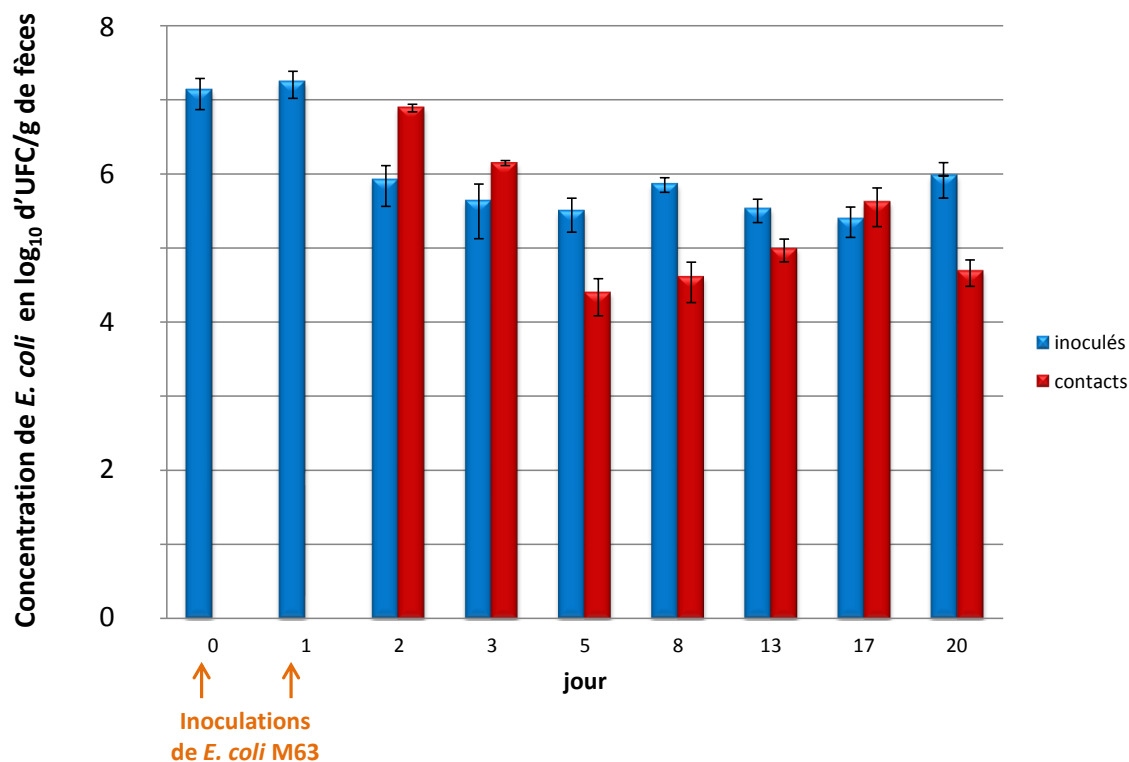


FIGURE 28. Dénombrement des *E. coli* résistants aux C3G et à la rifampicine

la préparation de la souche, qui s'implante sur les porcs inoculés et diffuse rapidement vers les autres animaux du même parc, sans provoquer de symptômes importants. Compte tenu de l'excrétion importante dès le lendemain de la première inoculation, il est décidé de n'inoculer les animaux qu'une seule fois pour l'essai visant à évaluer l'impact d'un traitement par Naxcel.

2.2 Article 2

Impact of ceftiofur injection on the microbiota and the *E. coli* resistance of pigs

M. A. Fleury^{1,2,3}, G. Mourand^{1,2}, E. Jouy^{1,2, 4}, F. Eono^{1,2}, R. Cariolet^{1,2}, A. Guérin^{1,2,4}, O. Le Goff³, S. Blanquet-Diot³, M. Alric³ and I. Kempf^{1,2} -

¹ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Ploufragan, France.

²Université Européenne de Bretagne, France.

³Clermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, EA 4678 CIDAM, Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, BP10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

⁴INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

Abstract

Resistance to extended spectrum cephalosporins (ESC) is an important health concern. The impact of the administration of a long-acting form of ceftiofur on the pig microbiota and resistance of ESC-resistant (ESCR) *E. coli* was studied. Pigs were orally inoculated with a *E. coli* M63 strain harbouring a conjugative plasmid carrying a *bla*_{CTX-M-1} gene. On the same day they were given or not a unique injection of ceftiofur. The fecal microbiota was studied by quantitative PCR of main bacterial groups and by quantification of short-chain fatty acids (SCFA). *E. coli* and ESCR *E. coli* were determined by culture and ESCR *E. coli* isolates were characterized. The copies of the *bla*_{CTX-M-1} gene were quantified.

The main perturbation of the microbiota was the significant but transitory decrease of the *E. coli* population after the ceftiofur injection. No major change in the SCFA quantities could be

attributable to the ceftiofur injection. The ESCR *E. coli* persisted in most pigs. Transfer of the *bla*_{CTX-M-1} gene to other *E. coli* of the microbiota was evidenced. Culture and PCR results showed that the treated group shed significantly more resistant strains one and three days after ESC injection. Thereafter, on most dates, no differences could be seen, but noticeably one pig of the non-treated group regularly excreted very high numbers of ESCR *E. coli*, and this probably lead to a higher contamination level in its pen. In conclusion, use of ESC, but also presence of high-shedder animals, are important features in the diffusion of resistance to ESC.

Running title (54 K max): impact of ceftiofur on pig microbiota and resistance

Key words: cephalosporin - pig - microbiota - antimicrobial resistance

Introduction

Resistance to extended spectrum cephalosporins (ESC) is a public health concern. Prevalence of Enterobacteriaceae resistant to ESC is reported in food-producing animals in various countries (1) and these resistant strains are sometimes present at alarming rates in the microbiota of animals (2, 3). In pigs as in humans, the most frequently reported extended-spectrum β -lactamases are CTX-M (4), encoded by genes present on conjugative plasmids. In some countries, the third and fourth generations of cephalosporins are authorized for pigs, for respiratory diseases, mastitis- metritis- agalaxia syndrome in sows, exudative epidermitis and meningitis. However off-label use for other conditions such as “blanket” prophylactic treatments has been reported (5). The impact of the use of ESC on the selection and

dissemination of ESC -resistant Enterobacteriaceae is debated (6-8) and very few data are available concerning the impact of these antimicrobials on the different bacterial populations of the pig microbiota and their metabolism. The present study was aimed at evaluating this impact, in controlled conditions, using ESC-resistant (ESCR) *E. coli* inoculated pigs. Cultural, molecular and biochemical methods were used to monitor the modifications of the composition of the microbiota, the susceptibility of *E. coli* and the levels of short chain fermentative metabolites. Experiments were performed in accordance with the animal welfare experimentation recommendations granted by the "Directions Départementales de la Protection des Populations des Côtes d'Armor" (Anses registration number B-22-745-1), and were approved by the ComEth ANSES/ENVA/UPEC ethical committee (authorization number 12-003).

Material and methods

Strains

The *E. coli* strain to be inoculated to the pigs was prepared in our laboratory in order to increase the likelihood of colonization of the animals. Thus *E. coli* were first isolated on MacConkey media from feces of piglets from the specific pathogen free (SPF) experimental swine herd of Anses Ploufragan (France). After identification par PCR (9), the strains were tested for the presence of K85, K87, K88, K81, K82 and F6(987P) *E. coli* pig pathogenicity antigens with antisera (Biovac, France) and the susceptibility was determined by disk diffusion assay and interpreted according to the recommendations of the CA-SFM (10). One randomly chosen pan-susceptible isolate UB12/059-3 was then made resistant to rifampicin by culture in Mueller Hinton media (MH) containing 250 mg/L rifampicin. The rifampicin resistant mutant was then used as receptor for *in vitro* conjugation with a ESCR *E. coli* 05-M63-1 from our strain collection. This ESCR *E. coli* originated from fecal material obtained

from a healthy pig at slaughterhouse. Conjugation was performed by mixing equal cultures of the recipient strain UB12/059-3 and the donator strain *E. coli* 05-M63-1 in MH media containing rifampicin (250 mg/L) and cefotaxime (32 mg/L). One ESCR transconjugant (M63) was obtained and further characterized by determination of the minimal inhibition concentrations (MIC) of different antimicrobials by micro-dilution using Sensititre plate (11), of its phylogenetic group (12), presence of *bla*_{CTX-M-1} gene (13) and replicon type (14). It was tested for the presence of K85, K87, K88, K81, K82 and F6(987P) antigens.

Animals and experimental design

Six animal rooms were used to house 56 Large White piglets obtained from the SPF flock of Anses Ploufragan. The piglets of 7 weeks of age were born from five sows and were randomized before the experiment. The animals did not receive any treatment with any antibiotics prior to the assay. Each room contained eight piglets placed in two pens of four animals. The same non supplemented feed was offered to the animals but its composition was changed on D2 according to the nutritional need of the animals. Strict biosecurity measures were implemented in order to avoid contamination of the pigs, including the use of an air filtration system and airlocks for each unit, the use of unit-specific clothes, and compulsory showering after visiting the pigs. The different experimental groups were as follows: non-treated control group (NT) in room 1, ceftiofur- treated group (T) in room 2, *E. coli* M63 inoculated group (M63) in rooms 3 and 6, and *E. coli* M63 inoculated, ceftiofur -treated group (M63-T) in rooms 4 and 5. The animals in rooms 1 to 4 were monitored up to 35 days after inoculation (D35) whereas the animals of rooms 5 and 6 were monitored only up to D8, as they were then included in another study.

Inoculation of *E. coli* M63 was given on D0. Each piglet from rooms 3 to 6 was orally given a 10 mL suspension prepared from *E. coli* M63 cultivated on MH agar containing cefotaxime (2

mg/L). The titer of the suspension was determined by spreading tenfold dilutions on MH plates. Piglets from rooms 1 and 2 were similarly inoculated with sterile medium. On D0, just after *E. coli* M63 inoculation, piglets from rooms 2, 4 and 5 were given a single intramuscular injection of ceftiofur (Naxcel, Pfizer) at the recommended dose of 5 mg/kg of body weight. The animal weights were individually recorded once a week. During the week, daily clinical examinations consisted of looking for general clinical signs and taking rectal temperatures. Pigs were euthanized on days 35 to 37 post-inoculation by intravenous injection of sodium pentobarbital followed by exsanguination, and lesions were observed. Individual fecal samples were collected from all animals from the day before inoculation (D-1) and on D1, D3, D7, D10, D13, D17, D22 and D28. The fecal samples were stored at -70°C until analysis.

Bacteriological analysis

Bacteriological analysis were conducted on samples collected from the six animal rooms during the first week and samples from the four animal rooms (rooms 1 to 4) thereafter. The titers of presumptive *E. coli* (red/pink colonies surrounded by hazy medium). for D-1, D1, D3, D10 and D22 and of ESCR Enterobacteriaceae on all sampling times of the individual fecal samples were determined by spreading 100 µL of tenfold dilutions on MacConkey agar plates without or with 2 mg/L cefotaxime in triplicates. After incubation, the colonies were enumerated and the titers were calculated for each pig and each day. The detection limit was 100 CFU/g of feces. From the cefotaxime-supplemented plate, five isolates per pig per day were tested for susceptibility to cefotaxime and to rifampicin by restreaking on MacConkey plates containing either 2 mg/L cefotaxime or 250 mg/L rifampicin. All cefotaxime-resistant and rifampicin- susceptible isolates as well as one cefotaxime- and rifampicin-resistant isolate per group and per day were stored for further analysis. They were identified with *E. coli*

specific PCR (9, 15). The presence of the *bla*_{CTX-M-1} gene was searched by PCR (13) and the phylogenetic groups were determined (12). After digestion with *Sma*I, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) profiles of a few isolates were compared to the profile of the inoculated *E. coli* M63 strain (16).

Molecular analysis

DNA extracts were prepared from 0.2 g of individual fecal samples according to Yu and Morrison (17) followed by Qiagen's DNA stool Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Each DNA extract was quantified using the Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) and was then adjusted to a concentration of 10 ng/μL. For all samples collected from pigs of the rooms 1 to 4, previously validated quantitative PCR (qPCR) analyses, all targeting 16S rRNA gene fragments, were carried out to evaluate the evolution of the abundance of the total bacterial population and of the numbers of *Bacteroides/Prevotella*, *Bifidobacterium*, *E. coli*, *Enterococcus* and *Lactobacillus/Leuconostoc/Prevotella* (18). qPCR for quantification of *bla*_{CTX-M-1} gene copies was performed (19) for samples collected from the six animal rooms during the first week and from the rooms 1 to 4 thereafter; the copy numbers were determined by comparison with decimal dilutions of plasmid DNA prepared from the *bla*_{CTX-M-1} gene previously cloned in the plasmid pCR®4-TOPO® in the One Shot® TOP10 *E. coli* strain (Life Technologies, St Aubin, France), according to the manufacturer's instructions.

Short-chain fatty acids dosage

Short-chain fatty acids (SCFA), considered fermentation markers, were analyzed by gas chromatography as described by Gerard-Champod *et al.* (20). Only samples collected from the four animal rooms 1 to 4 were analyzed. Acetic, propionic, isobutyric, butyric, isovaleric,

valeric, caprylic acids and heptanoate concentrations were quantified. Assays were performed after a deproteinization step with phosphotungstic acid and using 2-ethylbutyric acid as an internal standard.

Statistical analysis

For body weight gains, culture results and numbers of *bla*_{CTX-M-1} copies, all 48 pigs of rooms 1 to 6 were included to study the effect of the ceftiofur treatment during the first week. For the following days, or for quantification of bacterial groups by qPCR and metabolites, only animals from rooms 1 to 4 were included.

Differences between weight gains of animals or culturable *E. coli* titers from the different groups were analyzed by Kruskal -Wallis's test followed by Wilcoxon's test. The individual titers of culturable *E. coli* and ESCR Enterobacteriaceae and the gene copy numbers were log₁₀ transformed and significant differences between M63 and M63-T groups were searched by Wilcoxon' tests. For data concerning quantification of bacterial populations by qPCR and SCFA, a non-parametric Mann-Whitney test was performed to ensure that the four groups were similar at the beginning of the experiment on D-1. A normalization step ($\Delta\log=\log(Dx) - \log(D-1)$) was realized; then values were grouped per period (first week: D1, D3 and D7; second week: D10 and D13 and third period: D17, D22 and D28) and the normalized data of the different groups for the different periods were compared with a non-parametric Mann-Whitney test. Distributions were compared by chi-square or Fisher's exact test. For all tests, values of $P<0.05$ were considered statistically significant differences. All analyses were done in R 3.0.0 (R Core Team, 2013) using the stats package.

Results

Preparation of the inocula

The *E. coli* UB12/059-3 isolated from our SPF pig herd belonged to the phylogenetic group B1 and was shown by disk diffusion to be susceptible to amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefalotin, cefoxitin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, gentamicin, neomycin, nalidixic acid and ciprofloxacin. After conjugation between the rifampicin resistant mutant of *E. coli* UB12/059-3 and ESCR *E. coli* 05-M63-1, one isolate *E. coli* M63 was obtained. As the recipient *E. coli* UB12/059-3, *E. coli* M63 belonged to the B1 phylogenetic group and gave negative results with the tested K85, K87, K88, K81, K82 and F6(987P) antisera. The MICs of the *E. coli* M63 are presented in Table 1. *E. coli* M63 was resistant to beta-lactams including ESC, streptomycin and trimethoprim-sulfamethoxazole. Sequencing of the entire plasmid of *E. coli* M63 showed that it contained the following resistance genes: *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CMY-59}, *sul2*, *dfrA17* and *aadA5* (data not shown).

The titer of the *E. coli* M63 inoculum was 78×10^8 CFU per pig.

Clinical signs and body weight gains

Before the beginning of the trial, two piglets in the room 5 showed diarrhea symptoms and the presence of Rotavirus was detected by ELISA at the local veterinary diagnostic laboratory (data not shown). Subsequently, diarrhea signs were observed between D17 and D21 in seven and three animals of rooms 3 and 4 respectively, with again confirmed presence of Rotavirus. Otherwise no sign of diarrhea was detected during the three weeks following inoculation of *E. coli* M63. Rectal temperatures of pigs remained inferior to 40.0°C for the two weeks following inoculation except on D1 (four animals in M63-T group with temperatures of 40.1 to 40.3°C) and on D2 (one animal of M63 group with temperature of 41.0°C). No other clinical sign nor lesions at post-mortem were observed.

The mean body weight gains of animals are presented in Table 2. There was no significant differences between rooms or groups for the different periods after inoculation.

Isolation of *E. coli* and ESCR Enterobacteriaceae in fecal samples

The titers of culturable *E. coli* obtained on D-1, D1, D3, D10 and D22 are presented in Table 3. The day after injection of ceftiofur, the titer for the T group was significantly lower than for all other groups ($P<0.01$). On D3 and on D10, the titers of the two treated groups (T and M63-T groups) were significantly lower than the NT group ($P<0.05$ for each comparison).

No ESCR Enterobacteriaceae were detected in fecal samples before *E. coli* M63 inoculation nor in non-inoculated animals during the whole assay period. For inoculated pigs, individual titers were determined and means per group are presented in Table 4. Apart from the week following ceftiofur administration, individual fecal titers were usually between 10^3 and 10^5 CFU of ESCR Enterobacteriaceae per g of fecal sample. However one pig (No 4314) from the M63 group, regularly excreted much more ESCR Enterobacteriaceae than the other pigs of the same group. The ESCR Enterobacteriaceae titers in the samples collected from this pig on D3, D7, D10 and D13 were 1.3 to 2.1 Log₁₀ higher than those of all but one samples collected from the other pigs, and on D17, its titer was 0.6 Log₁₀ higher than those for other animals. Thus comparisons of the titers of M63 and M63-T groups were performed either with data from all pigs or after excluding this high shedder animal. In both cases, significant differences ($P<0.02$) between T and NT groups were observed on D1, D3 and D28, with titers from treated animals exceeding those from non-treated ones. No significant differences were observed for the other days. Furthermore, as the presence of a high shedder in the pen may have enhanced recontamination of the other animals of the same pen, the statistical analysis was also performed after withdrawal of the data of this pen and showed again that a significant difference could be observed on D1, D3 and D28.

Characterization of ESCR *E. coli*

A total of 759 isolates obtained on cefotaxime-supplemented media from M63 and M63-T groups were tested for cefotaxime and rifampicin resistance. Results confirmed that all isolates were resistant to cefotaxime. During the first days after inoculation, all the isolates were also resistant to rifampicin as the inoculated *E. coli* M63 (Table 5). But thereafter the mean percentages of rifampicin-resistant isolates decreased to a minimum of 47.5% on D28 in the M63 group and 70% on D17 in the M63-T group. It is noteworthy that the individual ratios of rifampicin-resistant and rifampicin-susceptible isolates varied widely, with some pigs yielding only rifampicin-resistant ones during all the experiment, some other ones (such as the super-shedder pig) yielding only rifampicin-resistant isolates except on D28, when all their isolates were rifampicin-susceptible, and others with results fluctuating from one sampling to another.

One hundred and eleven isolates, including all 89 rifampicin-susceptible and 22 rifampicin-resistant isolates (at least one per pen per day), were further analyzed. All belonged to the *E. coli* species, but 15 isolates collected on D22 and D28 in M63 and M63-T groups did not show characteristic *E. coli* colonies on MacConkey agar; these isolates gave typical blue colonies on TBX medium (data not shown), a characteristic of beta-glucuronidase positive strains, but apparently lacked the *uidA* sequences, target of the PCR described by Bej *et al.* (15). However they gave positive results for the PCR based on the 16S rRNA gene (9) and were identified as *E. coli* by MALDI-TOF (data not shown). All the 111 cefotaxime-resistant isolates harbored the *bla*_{CTX-M-1} gene. All the 22 cefotaxime- and rifampicin-resistant isolates obtained from D1 to D28 tested belonged to the phylogenetic B1 group as the M63 *E. coli*. In the M63 group, the phylogroup of fifty cefotaxime-resistant rifampicin-susceptible isolates was B1 (30 isolates), A/C (4 isolates), D/E (11 isolates), F (1 isolate) and E /clade I (4 isolates). In the M63-T group, the phylogroups of the cefotaxime-resistant rifampicin-

susceptible isolates were B1 (25 isolates), D/E (5 isolates), B2 (3 isolates) and F (6 isolates). The three B2 isolates were obtained from two animals from the same pen. D/E isolates were obtained from four animals housed in the same pen of room 3, but from only one pig of the room 4. All isolates of the F group were obtained from two pigs of the same pen in room 4. The PFGE analysis of a limited number of isolates showed that one rifampicin-resistant isolate of B1 group shared the profile of *E. coli* M63 while another one of the B1 group which was rifampicin susceptible had a profile distinct from the one of *E. coli* M63. Two isolates which had been obtained from two different pigs of the same pen of M63 group on D22 and D28 and were of the D/E group and gave negative results for the *uid* gene, shared the same PFGE profile. Two isolates obtained from two different pigs of the same pen of the M63 group on D28, belonging to the E/clade I group showed the same PFGE profile (data not shown).

Quantification of *bla*_{CTX-M-1} by qPCR

The detection limit of the *bla*_{CTX-M-1} PCR was 10⁴ copies per assay. Results for *bla*_{CTX-M-1} quantification are presented in Table 6. All the samples collected before inoculation or from non-inoculated pigs were negative. The total numbers of samples detected positive from D1 to D28 according to qPCR were 34/85 for M63 pigs versus 31/86 for M63-T ones (Chi2 test, $P>0.05$). During the week following the ceftiofur injection, the numbers of positive samples in the M63 and in the M63-T groups were respectively 19/47 and 28/48 (Chi2 test, $P>0.05$), but considering samples collected after the first week, fifteen out of 39 samples were found positive for M63 pigs compared to only three out of 38 for M63-T animals (Fisher test, $P=0.002$). It is noteworthy that all the 15 positive samples of the non-treated group were obtained from the pen housing the high-shedder pig, and all the pigs of this pen tested from D10 to D22 were always positive. Considering either the 16 pigs per group during the first

week, or after exclusion of the high-shedder, the number of copies of the *bla*_{CTX-M-1} gene of M63-T pigs were significantly higher compared to M63 group on D1 (Wilcoxon test, $P<0.01$) and D3 ($P<0.001$). On the contrary, M63-T animals excreted less copies of *bla*_{CTX-M-1} gene on D13 (Wilcoxon test, $P=0.03$ considering all pigs or $P=0.057$ after exclusion of pig 4314). No other significant difference could be observed.

Composition of the fecal microbiota

On D-1, the composition of the fecal microbiota based on molecular methods was similar for the four groups ($P>0.05$) for most bacterial groups, i.e all bacteria (mean number of 16S rRNA gene copies: 11.21 ± 0.15), *E. coli* (mean: 7.98 ± 0.50), *Bifidobacterium* (mean: 7.69 ± 0.71), *Bacteroides/Prevotella* (mean: 9.45 ± 0.15) and *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* (mean: 9.25 ± 0.57). The mean copy number for *Enterococcus* was 7.19 ± 0.38 , but differences between groups were observed ($P<0.05$ for each comparison). However, the means for *Enterococcus* of the four groups for the first and second weeks were very similar, ranking respectively from 7.02 to 7.13 and 7.21 to 7.47; concerning the evolution on the whole period (Figure 1), the increase of Enterococci was significantly more pronounced in the M63-T compared to all other groups ($P<0.001$ for each comparison). Another significant difference on D-1 was detected between groups NT and M63-T for *Bifidobacterium* ($P<0.05$). Afterwards, the *Bifidobacterium* counts decreased in the NT group but increased in all the other groups during the first week ($P<0.01$ for each comparison) and the global period ($P<0.01$ for each comparison).

For the NT group, the mean variations of the bacterial groups were inferior to 1 log during the different periods, except for the *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* population which showed an important decrease during the second (minus 1.4 log) and third periods (minus 1.7

log) compared to D-1 (Figure 1). On the whole period, this decrease was also registered for the other groups but was significantly less severe for the M63 and M63-T groups ($P<0.001$). During the first week after treatment, the main significant difference between groups was the drop of the *E. coli* 16S rRNA gene copy numbers for the T group (minus 1.6 log compared to D-1) compared to the NT group (minus 0.4 log compared to D-1, ($P<0.001$)). However at the end of the experiment, the mean values for the four groups were very close, from 7.94 (M63-T group) to 8.14 (T group). A particular attention was paid to the results obtained for the high shedder (pig No 4314). Noteworthy, on D-1, compared to the 31 other tested animals, according to qPCR, this pig had the highest level for *E. coli* (9.00 log₁₀) and the lowest for *Bacteroides* (9.02 log₁₀) . On six of the eight other sampling times after inoculation, this pig had the highest level for *E. coli* 16S rRNA gene copies in its group.

Short-chain fatty acids

At the beginning of the experiment, the levels of the major SCFA (acetate: 82.38 ±12.27 µmol/g), propionate (25.07± 4.53 µmol/g) and butyrate (30.28± 8.13 µmol/g) were similar between groups ($P>0.05$). For minor SCFA, the means on the first day were much lower: isobutyrate (1.81± 0.78 µmol/g), isovalerate (2.70±1.29 µmol/g), heptanoate (0.01± 0.03µmol/g), valerate (2.60 ±0.86 µmol/g) and caproate (0.47±0.65 µmol/g) and significant differences were observed for isobutyrate and isovalerate in NT compared to M63 groups ($P<0.05$ for each), heptanoate in T compared to M63-T groups ($P<0.001$), valerate and caproate in M63 compared to M63-T groups ($P<0.05$ for each). Thus for the following periods, only modifications of the main SCFA are described (Figure 2). During the first, second and third periods, acetate level variations were significantly different between the NT group and the other ones ($P<0.02$). On the first week after inoculation, the levels of butyrate

stayed relatively stable in the NT group, an evolution significantly different from the decrease observed for the two M63 inoculated groups ($P<0.001$) and the difference persisted during the second week ($P<0.02$); a similar and significant difference for acetate was also registered between the T group and the two M63 inoculated groups on the first week ($P<0.02$). For proprionate, the main difference was between relative stability observed for the NT group and the decrease of the M63-T group during the first and second weeks ($P<0.001$ for each pair) and between the M63-T group and the M63 or the T groups during the first and second week ($P<0.05$ for each pair), but the proprionate means were very close during the last period (from 17.64 $\mu\text{mol/g}$ for the T group to 19.56 $\mu\text{mol/g}$ for the NT group) .

Discussion

The purpose of this study was to compare the microbiota of pigs receiving an injection of a vegetable oil-based suspension of ceftiofur crystalline free acid, which is indicated for treatment of bacterial respiratory disease associated with *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis* and treatment of septicemia, polyarthritis or polyserositis associated with *Streptococcus suis* in pigs. The Summary of Product Characteristics of Naxcel reports that approximately 60 % and 15 % of the dose are excreted in the urine and faeces respectively, within 10 days after administration. Thus the impact of the unique administration of this long-acting form of ceftiofur on the faecal microbiota was analyzed using cultural, molecular and biochemical methods.

The experimental model described here was based on the preparation of a ESCR *E. coli*, obtained by conjugation between an isolate from our SPF swine herd and a *bla*_{CTX-M-1} harboring *E. coli* strain as this gene codes for the most frequent ESBL described in pigs in Europe. The *E. coli* M63 resulting strain was of the same phylogenetic group as the recipient and showed resistance to beta-lactams including ESC, streptomycin and trimethoprim-sulfamethoxazole, in accordance with the resistance genes being borne on the plasmid.

The inoculation of *E. coli* M63 resulted in limited symptoms in a few animals. The strain seemed to persist in all the inoculated pens up to the end of the experiment, as many isolates were rifampicin- and cefotaxime-resistant and belonged to the *E. coli* M63 phylogenetic group.

According to qPCR, the bacterial composition of the SPF pigs' microbiota was similar to that of farm animals (9). In the different groups, the *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* population decreased with time, an already observed phenomenon which is related to the evolution of pig microbiota during the weeks following weaning (21). The main impact of the

ceftiofur treatment was the significant decrease of the *E. coli* population during the first days after injection, and this was confirmed by the culture results obtained on D1 to D10. However on D22, the culturable *E. coli* levels were no longer different, and the numbers of 16S rRNA genes were slightly higher than their initial level. Thus in our conditions, a single intramuscular injection of the long-acting form of ceftiofur (Naxcel, Pfizer) at the recommended dose of 5 mg/kg of body weight conducted to a significant but transitory decrease of the *E. coli* population. Singer *et al.* (22) reported similar results in dairy cattle, after use of ceftiofur (2.2 mg/kg, intramuscularly, once daily for 5 days), whereas, for Cavaco *et al.* (23), administration of ceftiofur (3 mg/kg) once a day for 3 days by intramuscular injection, did not result in significant differences in the average counts of total coliforms. The differences of dosage and pharmaceutical forms are probably in part responsible for such different results.

Other significantly different evolutions of the bacterial populations compared to the NT group were sometimes encountered, as for *Bifidobacterium*, but such minor (less than one log₁₀) differences may result from the ceftiofur treatment, the *E. coli* M63 inoculation or both, or even the perturbations induced by the accidental Reovirus contamination which occurred in M63 and M63-T groups during the third and fourth weeks of the experiment. Few studies have reported the impact of cephalosporins on the microflora. In a mouse intestinal colonization model, Boetius Hertz *et al.* showed that beta-lactam antibiotics such as cefuroxime, cefotaxime, ampicillin, dicloxacillin, benzylpenicillin, aminocillin and meropenem, given subcutaneously once a day for three days had no impact on *Bacteroides* and aerobic Gram-positive flora evaluated by culture methods (24).

Concerning the main SCFA, no major change in their quantities could be attributable to the ceftiofur injection. Thyman *et al.* (25) showed that that controlling weaning diarrhoea with amoxicillin and zinc oxide reduced the concentration of SCFA, which they attributed to the

general bacterial inhibitory effect and specific inhibition of certain tissue-associated pathogens. However their experimental conditions were quite different as the control group was suffering from *E. coli* diarrhoea.

Cultural and non-cultural methods were used to evaluate the impact of the ESC administration on the antimicrobial resistance of Enterobacteriaceae. Bacteriological methods enabled the detection of the transfer of the *bla*_{CTX-M} gene from *E. coli* M63 to other *E. coli* strains. In both inoculated groups, this transfer occurred, mainly after the first week after inoculation, as indicated by the finding of rifampicin-susceptible ESCR *E. coli*. Transfer to isolates of the phylogenetic group B1 seemed the most frequent with 28/41 (68%) and 25/39 (64%) isolates among the cefotaxime-resistant and rifampicin-susceptible isolates in the non-treated and in the treated animals respectively. No attempt to study more deeply the diversity of these B1 *E. coli* isolates was made. Isolates of the B2, I/E and F groups were obtained from animals of a unique pen each, suggesting maybe a single plasmid transfer event followed by diffusion of the newly ESC-resistant isolate to other animals. Transfer seemed limited to *E. coli* as all the colonies, even the ones with a non characteristic morphology on cefotaxime-supplemented MacConkey plates, could be identified as *E. coli* by a PCR test based on 16S rRNA gene sequence and MALDI-TOF assay. Isolates with the non-characteristic morphology had possibly a variant sequence for the *uidA* gene resulting in negative result for the molecular test based on this gene, nevertheless they probably had a functional beta-glucuronidase gene, as indicated by their aspect on TBX media.

According to cultures on cefotaxime supplemented media, more than ten-fold higher titers were observed for treated animals one and three days after the unique administration of the long-acting form of ceftiofur. The results of qPCR for the *bla*_{CTX-M-1} gene also showed significantly higher numbers for treated pigs on D1 and D3. Thereafter no difference could be detected by culture, except on the last sampling on D28, when again treated animals excreted

425 more than ten times more resistant isolates than non-treated ones. Because this sampling was
426 the last one, it is difficult to determine whether the increase observed on D28 would have
427 lasted or not. It is also important to underline the fact that one pig of the non-treated group
428 excreted much more ESC-resistant bacteria and *bla*_{CTX-M-1} copies than the other ones. Such
429 differences in the excretion of resistant strains between animals has already been described by
430 Horton *et al.* (26) who reported the presence of animals designated high-density shedders (>1
431 $\times 10^4$ CFU of CTX-M-positive *E. coli* organisms /g of feces) among cattle, chickens and pigs.
432 The authors hypothesized that the high levels of CTX-M *E. coli* shedding could be related to
433 the use of cephalosporins or other co-selecting antimicrobials. However, it is clear that in our
434 experiment, the high-shedder pig belonged to the non-treated group and this animal had
435 nether received antimicrobials. It is interesting to underline that the fecal microbiota of this
436 pig, was already particular at the beginning of the experiment with, among all included
437 animals, the respectively highest and lowest levels of *E. coli* and *Bacteroides*. This pig was
438 also the lighter male piglet of its group at the time of inoculation. These super-shedder
439 animals are probably quite important from an epidemiological point of view as they may
440 disseminate the infection very effectively, particularly in animals such as pigs with
441 coprophagic or burrowing habits, and are probably a heavy source of contamination of
442 carcasses in the food chain. In our experiment, the presence of one high-shedder in the non-
443 treated group probably had a direct effect on the ESCR *E. coli* mean of this group, and we
444 tried to evaluate this impact by withdrawing the data from this animal. The difference
445 between groups was then significant for the same days (D1, D3 and D28 for culture and D1
446 and D3 for qPCR for *bla*_{CTX-M-1}). However the exclusion of this animal does not eliminate the
447 indirect effect of the high excretion of this pig, which could heavily re-contaminate the other
448 animals of the same pen and could partially mask the impact of ceftiofur injection in the
449 treated group. Thus statistical analysis of culture data was thus also performed excluding data

from the pen with the high-shedder; even in this case, culture results were still significantly different only for D1, D3 and D28. Because of the relatively low sensitivity of the qPCR for *bla*_{CTX-M-1}, many samples collected after the first week from pigs not housed in the pen of the high-shedder, were negative, thus hampering comparison between pens.

In the study of Cavaco *et al.* (23), the titres of CTX-M producing *E. coli*, either from indigenous origin or inoculated ones, were about 100-fold higher in the feces of cephalosporin-treated pigs than in controls for at least 22 days after the end of treatment. The cephalosporins used in their study were either ceftiofur hydrochloride at 3 mg/kg or cefquinom at 2 mg/kg, both given once a day for three days. The apparently higher impact of these treatments compared to our study may be related to the differences in pharmacokinetics of the drugs or to differences in resistance levels, fitness of the strains present in the digestive tract, the presence of a high-shedder in our non-treated experimental group or other experimental conditions.

Impact of ceftiofur has also been studied in experiments conducted on other animal species. According to Lowrance *et al.* (27), administration of ceftiofur in feedlot cattle resulted in a transient increase in the population of ceftiofur-resistant isolates and susceptibility returned to before treatment values after two weeks. The authors also underlined that co-resistance was quite frequent (27). In a longitudinal study of feedlot cattle treated or not with ceftiofur (22), only a transient increase of ESCR *E. coli* shedding followed ceftiofur injection and the authors concluded that therapeutic use of ceftiofur in this cattle feedlot did not significantly increase the herd prevalence of ESCR *E. coli*. In the study of Schmidt *et al.* (28), the transient increase of ESCR *E. coli* was mainly due to the clonal expansion of a feedlot-adapted *bla*_{CMY-2} *E. coli* rather than to the horizontal transfer of the IncA/C plasmid. This reinforces the idea that the level and the duration of the impact of ESC administration depends on the conditions

of the experiment (individual or collective treatments, fitness of ESCR strains and resistance genes...).

Epidemiological studies have also been conducted to decipher the relations between ESC use and prevalence of ESC-resistance in pigs. A significant association between use and susceptibility to cefotaxime was reported by Jorgensen *et al.* (6) for samples collected in piglets and slaughter pigs at the farm and by Agerso *et al.* (29) for samples collected in slaughterhouses in Denmark. However in the USA, Mollenkopf *et al.* (7) did not observe an association between antimicrobial use and recovery of coliform bacteria harboring *bla*_{CTX-M} in livestock populations. But again impact of ESC use probably depends on many different epidemiological factors such as initial prevalence of resistance, variety of resistance genes, plasmids and strains and their associated fitness, management of livestock and other antimicrobial treatments, biosecurity measures... Anyway, in order to stop the increasing prevalence of ESCR *E. coli* in pigs, countries such as Denmark or France have decided a voluntary ban of ESC in this production. This measure has already resulted in reduced ESC *E. coli* in slaughter pigs in Denmark (30) and in pathogenic *E. coli* from pigs in France (31), and should be considered as a promising intervention for other countries .

Conclusion

The results of our experiment clearly revealed , by cultural and molecular methods on faecal samples, a significant but transient decrease of the culturable *E. coli* population and a transitory increase on the ESCR *E. coli* population. Our observations also suggested that the presence of a ESCR-*E. coli* high-shedder animal resulted in more frequent recontamination between animals in the non-treated group and such animals are probably of major importance for the epidemiology of resistance. Thus limiting the use of ESC and implementing a better

control of ESCR-*E. coli* high-shedder animals are important measures to limit the selection and spread of ESCR Enterobacteriaceae.

References

1. **EFSA.** 2011. Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal* **9**:2322.
2. **Hu YY, Cai JC, Zhou HW, Chi D, Zhang XF, Chen WL, Zhang R, Chen GX.** 2013. Molecular typing of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from environmental water, swine feces, specimens from healthy humans, and human patients. *Applied and environmental microbiology* **79**:5988-5996.
3. **Ramos S, Silva N, Dias D, Sousa M, Capelo-Martinez JL, Brito F, Canica M, Igrejas G, Poeta P.** 2013. Clonal diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* in pigs at slaughter level in Portugal. *Foodborne pathogens and disease* **10**:74-79.
4. **Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH.** 2012. Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **18**:646-655.
5. **Trott D.** 2013. beta-lactam resistance in gram-negative pathogens isolated from animals. *Current pharmaceutical design* **19**:239-249.
6. **Jorgensen CJ, Cavaco LM, Hasman H, Emborg HD, Guardabassi L.** 2007. Occurrence of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* in pigs treated with ceftiofur. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **59**:1040-1042.

7. **Mollenkopf DF, Mirecki JM, Daniels JB, Funk JA, Henry SC, Hansen GE, Davies PR, Donovan TS, Wittum TE.** 2013. *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M cephalosporinase from swine finishing barns and their association with antimicrobial use. *Applied and environmental microbiology* **79**:1052-1054.
8. **Lutz EA, McCarty MJ, Mollenkopf DF, Funk JA, Gebreyes WA, Wittum TE.** 2011. Ceftiofur use in finishing swine barns and the recovery of fecal *Escherichia coli* or *Salmonella* spp. resistant to ceftriaxone. *Foodborne pathogens and disease* **8**:1229-1234.
9. **Furet JP, Firmesse O, Gourmelon M, Bridonneau C, Tap J, Mondot S, Dore J, Corthier G.** 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS microbiology ecology* **68**:351-362.
10. **CA-SFM.** 2012. Comité de l'antibiogramme de la Société française de Microbiologie-recommandations 2012.
11. **CLSI.** 2008. M31-A3, Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard - third edition. 3rd ed. CLSI, Wayne, PA.
12. **Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM.** 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental microbiology reports* **5**:58-65.
13. **Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ.** 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **57**:154-155.

14. **Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, Loli A, Colinon C, Villa L, Whichard JM, Rossolini GM.** 2006. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerging infectious diseases* **12**:1145-1148.
15. **Bej AK, DiCesare JL, Haff L, Atlas RM.** 1991. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Applied and environmental microbiology* **57**:1013-1017.
16. **Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ.** 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne pathogens and disease* **3**:59-67.
17. **Yu Z, Morrison M.** 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques* **36**:808-812.
18. **Saint-Cyr MJ, Perrin-Guyomard A, Houee P, Rolland JG, Laurentie M.** 2013. Evaluation of an oral subchronic exposure of deoxynivalenol on the composition of human gut microbiota in a model of human microbiota-associated rats. *PloS one* **8**:e80578.
19. **Ellem J, Partridge SR, Iredell JR.** 2011. Efficient direct extended-spectrum β -lactamase detection by multiplex real-time PCR: Accurate assignment of phenotype by use of a limited set of genetic markers. *Journal of clinical microbiology* **49**:3074-3077.
20. **Gerard-Champod M, Blanquet-Diot S, Cardot JM, Bravo D, Alric M.** 2010. Development and validation of a continuous in vitro system reproducing some biotic and abiotic factors of the veal calf intestine. *Applied and environmental microbiology* **76**:5592-5600.

- 571 21. **Heo JM, Kim JC, Hansen CF, Mullan BP, Hampson DJ, Pluske JR.** 2009.
572 Feeding a diet with decreased protein content reduces indices of protein fermentation
573 and the incidence of postweaning diarrhea in weaned pigs challenged with an
574 enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Journal of animal science* **87**:2833-2843.
- 575 22. **Singer RS, Patterson SK, Wallace RL.** 2008. Effects of therapeutic ceftiofur
576 administration to dairy cattle on *Escherichia coli* dynamics in the intestinal tract.
577 *Applied and environmental microbiology* **74**:6956-6962.
- 578 23. **Cavaco LM, Abatih E, Aarestrup FM, Guardabassi L.** 2008. Selection and
579 persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated
580 with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrobial agents and chemotherapy*
581 **52**:3612-3616.
- 582 24. **Boetius Hertz F, Lobner-Olesen A, Frimodt-Moller N.** 2014. Antibiotic Selection
583 of *Escherichia coli* Sequence Type 131 in a Mouse Intestinal Colonization Model.
584 *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**:6139-6144.
- 585 25. **Thymann T, Sorensen KU, Hedemann MS, Elnif J, Jensen BB, Banga-Mboko H,**
586 **Leser TD, Sangild PT.** 2007. Antimicrobial treatment reduces intestinal microflora
587 and improves protein digestive capacity without changes in villous structure in
588 weanling pigs. *The British journal of nutrition* **97**:1128-1137.
- 589 26. **Horton RA, Randall LP, Snary EL, Cockrem H, Lotz S, Wearing H, Duncan D,**
590 **Rabie A, McLaren I, Watson E, La Ragione RM, Coldham NG.** 2011. Fecal
591 carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum {beta}-lactamase-
592 producing *escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental
593 contamination and food production. *Applied and environmental microbiology*
594 **77**:3715-3719.

27. **Lowrance TC, Loneragan GH, Kunze DJ, Platt TM, Ives SE, Scott HM, Norby B, Echeverry A, Brashears MM.** 2007. Changes in antimicrobial susceptibility in a population of *Escherichia coli* isolated from feedlot cattle administered ceftiofur crystalline-free acid. *American journal of veterinary research* **68**:501-507.
28. **Schmidt JW, Griffin D, Kuehn LA, Brichta-Harhay DM.** 2013. Influence of therapeutic ceftiofur treatments of feedlot cattle on fecal and hide prevalences of commensal *Escherichia coli* resistant to expanded-spectrum cephalosporins, and molecular characterization of resistant isolates. *Applied and environmental microbiology* **79**:2273-2283.
29. **Agerso Y, Aarestrup FM, Pedersen K, Seyfarth AM, Struve T, Hasman H.** 2012. Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **67**:582-588.
30. **Agerso Y, Aarestrup FM.** 2013. Voluntary ban on cephalosporin use in Danish pig production has effectively reduced extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in slaughter pigs. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **68**:569-572.
31. **Jarrige N, Jouy E, Haenni M, Gay E, Madec JY.** 2014. Resapath, bilan 2013 (www.resapath.anses.fr).

621

622 Figure 1: Evolution of main bacterial populations of the fecal microbiota in the different
623 groups

624 A normalization step ($\Delta\log = \log(Dx) - \log(D-1)$) was realized; and values were grouped per
625 period (first week: D1, D3 and D7; second week: D10 and D13 and third period: D17, D22
626 and D28)

627

628

629 Figure 2: Evolution of short-chain fatty acids of the fecal microbiota in the different groups

630

Table 1: MIC (mg/L) of *E. coli* M63

AMP	CTX	FOX	MEM	CHL	COL	STR	GEN	TET	SMX	SXT	NAL	CIP
>128	>2	≤8	≤0.12	8	≤0.5	32	0.5	4	>512	>16/304	4	0.03

AMP, ampicillin; CTX, cefotaxime; FOX, ceftiofur; MEM, meropenem; CHL, chloramphenicol; COL, colistin; STR, streptomycin; GEN, gentamicin; TET, tetracycline; SMX, sulfamethoxazole; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin

Table 2: mean body weight gains (kg)

Room	Group	Days			
		D0-D7	D0-D14	D0-D21	D0-D37
Room1	NT	6.7 ± 1.0 ^b	13.5± 1.27	20.2± 2.5	26.85 ±3.1
Room 2	T	6.8 ± 1.5	13.2± 3.0	18.1 ± 3.6	24.4 ± 4.5
Room 3	M63	6.1 ± 1.0	12.8 ±1.7	17.6 ± 2.0	23.65 ±2.5
Room 6 ^a		6.2 ±1.5			
Room 4	M63-T	6.8 ± 0.8	13.4 ±1.4	17.5 ± 1.5	25.2 ± 2.0
Room 5 ^a		7.5 ± 0.7			

^aAnimals of rooms 5 and 6 were included only for the first week

^bNo significant differences of body weight gains between rooms or groups for the different periods ($P>0.05$)

Ceftiofur was given on D0 to groups T and M63-T and *E. coli* M63 was inoculated on D0 to groups M63 and M63-T.

Table 3: Mean culturable *E. coli* titers in fecal samples (log₁₀ CFU/g)

Group	Day				
	D-1	D1	D3	D10	D22
NT	6.15 ± 0.31 ^a	6.30± 0.51 ^a	6.46 ±0.47 ^a	6.33 ± 0.49 ^a	6.35 ± 0.71 ^a
T	6.21 ± 0.45 ^a	5.32± 0.35 ^b	4.67± 0.43 ^c	5.83± 0.28 ^{cde}	6.59 ± 0.42 ^a
M63	6.08 ± 0.65 ^a	6.13 ± 0.36 ^a	6.24 ± 0.39 ^{ab}	5.94 ± 0.45 ^{ad}	6.53 ± 0.39 ^a
M63-T	5.74 ± 0.32 ^a	6.27 ± 0.47 ^a	5.67 ± 0.62 ^b	5.58 ± 0.34 ^{bc}	6.26 ± 0.37 ^a

Values in a row not sharing the same superscripts are significantly different, $P<0.05$

Ceftiofur was given on D0 to groups T and M63-T and *E. coli* M63 was inoculated on D0 to groups M63 and M63-T.

Table 4: Mean cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae in the individual faecal samples (log₁₀ CFU/g)

	Day							
Group [*]	D1	D3	D7	D10	D13	D17	D22	D28
M63	4.7 ±2.4 ^a	3.7 ±1.7 ^a	3.3 ±2.0 ^a	4.2 ±1.1 ^a	4.7 ±1.8 ^a	4.5 ± 1.7 ^a	4.3 ± 1.4 ^a	2.8 ±1.2 ^a
M63-T	5.8± 1.7 ^b	5.25 ±0.95 ^b	3.35 ±1.35 ^a	3.8 ±0.4 ^a	3.7 ±0.4 ^a	3.1 ± 0.7 ^a	4.0 ± 0.5 ^a	3.9 ±0.6 ^b

^{*}No cefotaxime resistant Enterobacteriaceae were isolated from the non- inoculated groups or before inoculation of *E. coli* M63

For D1, D3 and D7, sixteen samples per group were tested; for D10, D13, D17, D22 and D28, eight samples per group were tested

Values in a row not sharing the same superscripts are significantly different, $P<0.05$

Ceftiofur was given on D0 to groups T and M63-T and *E. coli* M63 was inoculated on D0 to groups M63 and M63-T.

Table 5: Ratios of rifampicin-resistant isolates among cefotaxime-resistant *E. coli* isolates

Group	Day							
	D1	D3	D7	D10	D13	D17	D22	D28
M 63	65/65 ^a (100%)	51/51 ^a (100%)	54/57 ^a (95%)	36/40 ^a (90%)	26/35 ^a (74%)	38/40 ^a (95%)	29/40 ^a (72.5%)	19/40 ^a (47.5%)
M 63-T	79/79 ^a (100%)	76/76 ^a (100%)	36/36 ^a (100%)	36/40 ^a (90%)	35/40 ^a (87.5%)	28/40 ^b (70%)	29/40 ^a (72.5%)	33/40 ^b (82.5%)

Values in a row not sharing the same superscripts are significantly different, P<0.05

Ceftiofur was given on D0 to groups T and M63-T and *E. coli* M63 was inoculated on D0 to groups M63 and M63-T.

Table 6: mean log₁₀ copies of the *bla*_{CTX-M-1} gene and numbers of pigs shedding the *bla*_{CTX-M-1} gene according to qPCR

	Day							
Group	D1	D3	D7	D10	D13	D17	D22	D28
M 63	2.87 ±1.50 ^{a#}	0.73± 1.34 ^a	0.51 ± 1.45 ^a	1.49±1.63 ^a	1.86±2.18 ^a	1.61 ±1.81 ^a	0.93 ±1.16 ^a	0.00 ±0.00 ^a
	13/16§	4/15	2/16	4/8	4/8	4/8	3/7	0/8
M 63-T	3.76 ± 1.55 ^b	2.35± 1.57 ^b	0.29 ± 0.20 ^a	0.25 ^a ±0.71 ^a	0.00 ±0.00 ^b	1.11 ^a ±1.72 ^a	0.00 ±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
	14/16	12/16	2/16	1/8	0/8	2/6	0/8	0/8

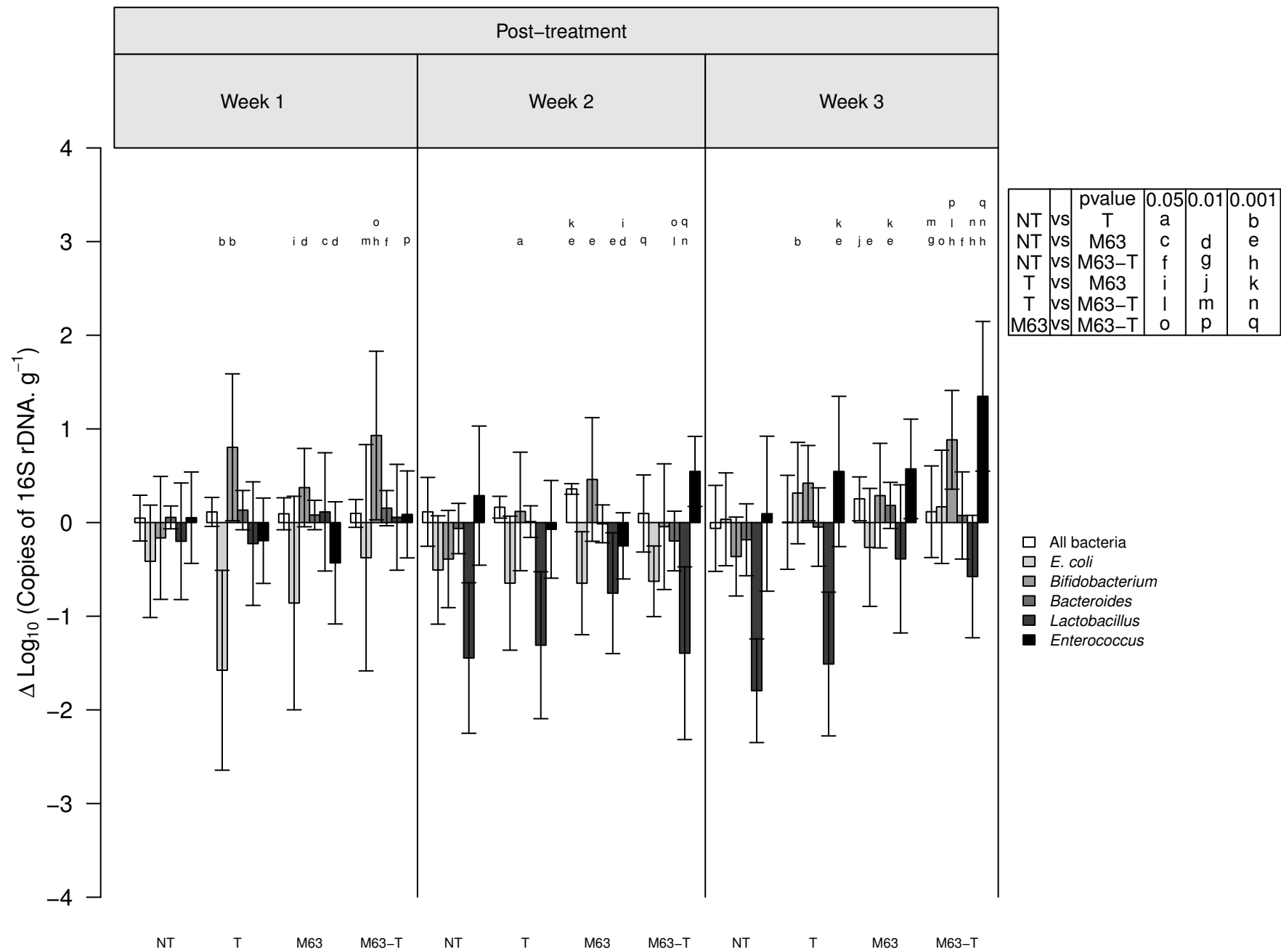
[#] mean log₁₀ copies/10 ng DNA ± standard deviation (results including the high-shedder pig)

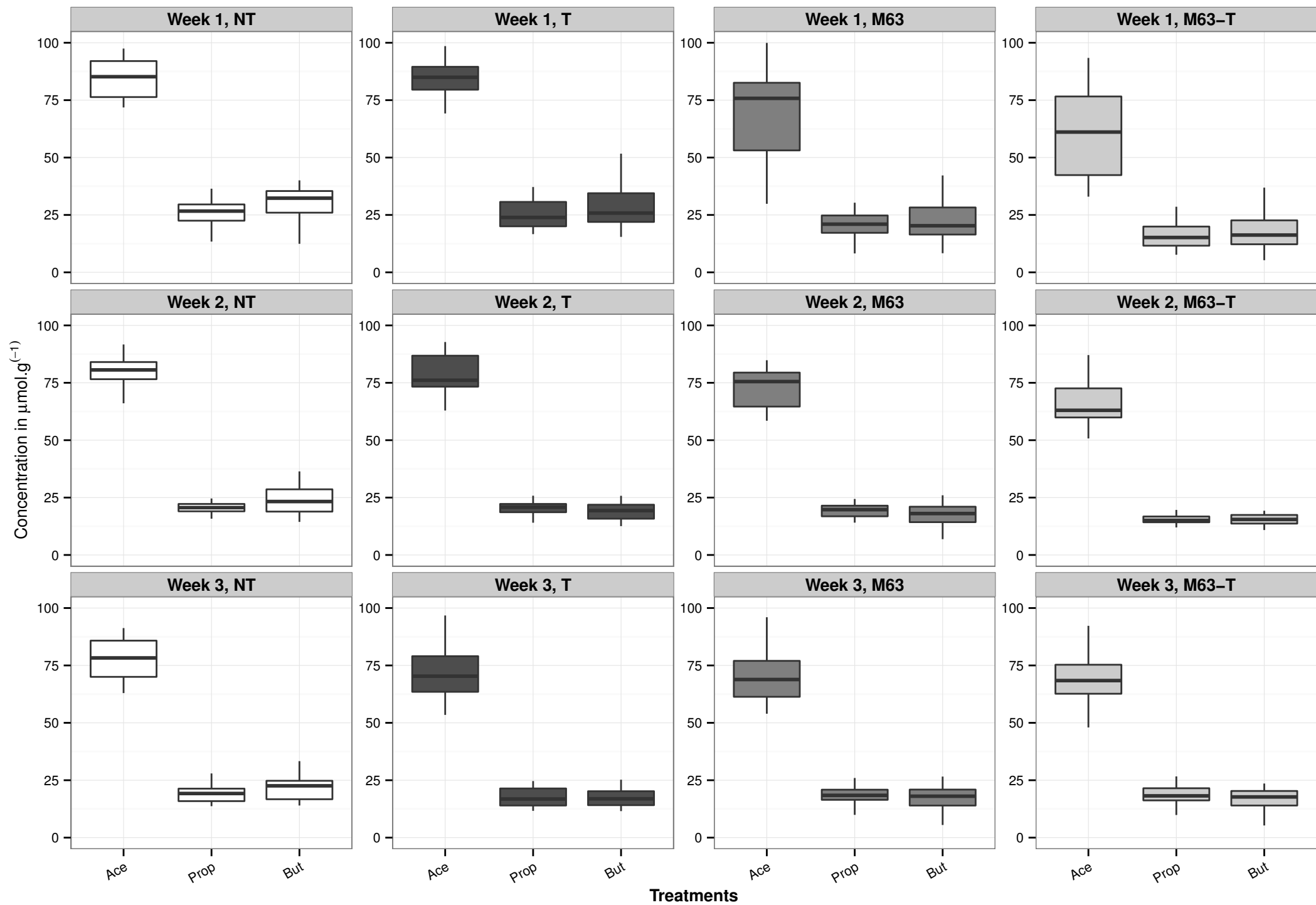
[§] number of positive samples/ number of tested samples

Values in a row not sharing the same superscripts are significantly different, *P*<0.05

Results for samples from non-inoculated animals or collected before inoculation were negative

Ceftiofur was given on D0 to groups T and M63-T and *E. coli* M63 was inoculated on D0 to groups M63 and M63-T.





2.3 Discussion / Perspectives

Les travaux réalisés ont permis de développer un modèle de colonisation de porcs EOPS par une souche non pathogène de *E. coli* rendue résistante à la rifampicine et aux C3G. Le mode de préparation de la souche à partir d'une souche receveuse provenant du troupeau EOPS a sans doute facilité l'implantation de *E. coli* M63 dans le microbiote des porcelets. De plus, sa double résistance a permis une analyse des transferts du gène *bla*_{CTX-M-1} vers les autres souches d'Enterobactéries présentes dans le microbiote. Le modèle expérimental décrit a ensuite servi, outre l'expérimentation visant à évaluer l'impact de l'administration de Naxcel, à plusieurs autres essais pratiqués au laboratoire. Le dispositif expérimental a été complété, dans le cadre d'autres projets, par la mise en place sous les parcs de bacs permettant la récupération de lisiers pouvant être conservés afin d'évaluer la persistance des bactéries résistantes ou des gènes de résistance dans le temps, et en fonction des modalités de traitement des lisiers.

Les faits marquants qui ressortent de cette expérience de traitement des porcs par ceftiofur sous forme galénique à libération prolongée dans le temps consistent en la mise en évidence d'une baisse transitoire des Entérobactéries, accompagnée d'une augmentation significative de l'excrétion de *E. coli* résistants aux C3G. Cette augmentation joue probablement un rôle important dans l'épidémiologie de la diffusion de la résistance, en favorisant la contamination ou la re-contamination entre animaux d'un même lot. La comparaison de nos résultats avec ceux d'autres équipes (Cavaco et al., 2008) est difficile du fait de conditions expérimentales différentes (forme galénique du ceftiofur, statut des animaux...). Ainsi Cavaco et al. (2008) observent un impact du traitement par ceftiofur ou cefquinome sur l'excrétion de *E. coli* résistants jusqu'au 25^{ème} jour, alors que nous n'enregistrons une différence significative d'excrétion entre traités et non-traités que lors des tout premiers jours après traitement et 28 jours après, dernier jour de prélèvement avant abattage. Compte tenu de l'absence de prélèvements ultérieurs, il est difficile de préciser les causes de cette évolution fluctuante. Toutefois l'épisode de diarrhée à Rotavirus en fin d'essai ou la présence d'un porc super-excréteur dans le lot non-traité ont pu compliquer la comparaison entre lots traités et non traités.

L'un des points importants de ce suivi expérimental est la mise en évidence de l'importance de la présence d'animaux fortement excréteurs de bactéries résistantes. Dans le cadre de cette expérimentation, un porc présentait ce statut particulier, et nous avons pu détecter d'autres particularités liées à cet animal, telles que son phénotype (faible poids de naissance) et son microbiote (fort taux de *E. coli*, faible population de *Bacteroides*). Nous avons aussi pu observer que cet animal était fortement excréteur sur plusieurs prélèvements consécutifs.

Les perspectives de ce travail sont multiples. Comme pour le travail sur la colistine, une étude métagénomique du microbiote devrait être conduite afin d'évaluer plus finement les modifications du microbiote lors du traitement, et de rechercher les particularités du microbiote du porcelet super-excréteur, en comparaison de ses congénères. Il serait particulièrement intéressant de mieux comprendre les causes de cette excrétion massive par certains animaux, afin de mieux les détecter soit au stade de l'élevage pour réduire la transmission inter-animaux par exemple, en mettant en place des mesures de biosécurité (séparation des animaux fortement

excréteurs), soit au stade de l'abattoir en mettant en place des mesures visant à éviter une trop forte contamination de la chaîne alimentaire (abattage en fin de journée). Si le fort taux d'excrétion est effectivement associé à un microbiote particulier, des mesures correctives (modification de l'alimentation, administration de probiotiques. . .) pourraient aussi être envisagées et évaluées. Enfin, s'il s'avérait que ce caractère de fort excréteur soit d'origine génétique, une contre-sélection pourrait être envisagée, sous réserve que ce caractère ne soit pas associé à d'autres qualités génétiques positives des animaux.

Par ailleurs, le modèle développé à l'aide de la souche *E. coli* M63 ou des variantes de ce modèle (contamination des porcelets sous la mère ou à un âge plus avancé, contamination des truies et transmission verticale de la résistance. . .) pourront être utilisés pour des travaux de modélisation de la diffusion de la résistance entre animaux, en fonction de différents paramètres tels que le taux d'animaux porteurs de *E. coli* résistants dans un lot, l'administration d'un traitement à un animal porteur ou non porteur au sein d'un lot porteur, etc. Cette modélisation permettrait de mieux évaluer les conséquences d'un traitement à différents âges ou stades de production, d'un traitement individuel ou collectif dans un élevage, et ainsi de mieux définir les modalités de contrôle de maladies infectieuses les plus respectueuses en matière d'antibiorésistance.

Chapitre 3

Modélisation *in vitro* de l'environnement digestif du porcelet

Sommaire

3.1	Introduction	149
3.2	Article 3	151
3.3	Discussion / Perspectives	174

3.1 Introduction

Avec les limitations de l'expérimentation animale et donc la diminution des animaux d'expérimentation pour la recherche agronomique (Juin et al., 2014), il semble de plus en plus pertinent de se tourner vers des méthodes alternatives aux expérimentations *in vivo* et donc, de mettre au point des outils de modélisation de l'environnement digestif. Parmi les systèmes développés à ce jour pour simuler cet environnement chez le porc, beaucoup sont des systèmes simples de type « batch » et les études dans de tels systèmes se trouvent limitées à quelques heures. Plus récemment, des systèmes semi-continus ou continus (Pinloche et al., 2012; Tanner et al., 2014a) ont été développés : intégrant de manière beaucoup plus dynamique et réaliste les paramètres essentiels de la fermentation colique chez le porc ou la truie, ils permettent de mener des expérimentations sur des durées beaucoup plus longues que les systèmes « batch » (Bindelle et al., 2007, 2009; Pieper et al., 2009a; Bindelle et al., 2011) mais aucun ne reproduit la fermentation colique spécifique chez le porcelet. Or, il est bien connu que les premières étapes de la vie du porcelet, et plus spécifiquement la période de post-sevrage, représentent des phases critiques dans la croissance du jeune porcelet (Marchesi and Shanahan, 2007). En particulier, la prise d'antibiotiques sur cette période de post-sevrage soulève de nombreuses questions et pouvoir y répondre représente un réel enjeu sanitaire et économique.

Aussi, le deuxième objectif de ce travail de thèse a été de développer et valider un modèle

in vitro colique porcin, spécifiquement dédié à la fermentation colique du porcelet (contexte de notre étude). Ayant réalisé, dans la première étape de ce doctorat, des études *in vivo*, visant à mieux comprendre l'impact d'antibiotiques sur le microbiote intestinal de porcelets, il nous a paru judicieux d'une part, de mettre en place ce modèle en y introduisant les paramètres mesurés *in vivo* chez ces porcelets et d'autre part, de valider ce modèle, par rapport aux données obtenues *in vivo*, dans deux cas d'étude, i) dans des conditions de fermentation normales, dites « normobiose », et ii) dans des conditions de prise d'un traitement antibiotique entraînant un état de « dysbiose » de l'écosystème intestinal.

Le modèle « P-ECSIM » (Feria-Gervasio et al., 2011), mis en place au laboratoire, a été adapté afin de simuler le côlon du porcelet dans sa globalité. Pour cela, plusieurs paramètres ont été introduits dans cet environnement comme le pH, la température et le potentiel d'oxydo-réduction du côlon, paramètres mesurés *in vivo* lors d'autopsies des porcelets ayant servi à notre première étude. Le milieu nutritif, simulant les composés arrivant à l'entrée du côlon humain (Macfarlane et al., 1998) a aussi été modifié afin de se rapprocher au mieux de l'alimentation, principalement végétale, du porcelet. Enfin, comme décrit dans la partie bibliographique de ce mémoire (c.f. 3.1.2.6, page 64), ce modèle « P-ECSIM » permet de maintenir un état d'anaérobiose grâce aux seuls gaz produits par la simple activité fermentaire du microbiote. La conservation de cet état d'anaérobiose permanent a été vérifiée par analyse quotidienne des gaz issus de la fermentation (CPG). Ce nouveau modèle *in vitro* a été appelé « PigutIVM ».

La validation du modèle « PigutIVM » a ensuite été réalisée en comparant les résultats obtenus dans ce modèle aux données précédemment obtenues *in vivo* et ce, dans les deux conditions « normobiose » (animaux non traités) et « dysbiose » (animaux ayant reçu un traitement à la colistine). Cet antibiotique a été introduit *in vitro* à la dose, utilisée sur le terrain, ayant le plus grand effet *in vivo* sur le microbiote des porcelets EOPS.

Puis, le modèle « PigutIVM » a été utilisé pour évaluer l'impact d'un probiotique, *Saccharomyces cerevisiae* spp. *boulardii*. Ce dernier a été choisi en raison de son utilisation antérieure chez le porcelet (Chaucheyras-Durand and Durand, 2010; Cho et al., 2011), avec l'objectif de pouvoir apporter des éléments supplémentaires *in vitro* en adéquation avec l'effet démontré *in vivo* de ce probiotique sur la santé humaine.

Les quantités des principales populations de microorganismes suivies ont été analysées avec la même méthode que celle utilisée lors des essais *in vivo* (qPCR) de façon à pouvoir comparer plus facilement les résultats obtenus. De même, les productions d'AGCC ont été mesurées. L'ensemble de ces analyses doit permettre d'apprécier l'évolution de l'écosystème colique au cours du temps, sa diversité et une partie de son activité métabolique.

Les objectifs, les conditions expérimentales et les résultats obtenus sont présentés dans l'article 3 de ce travail de thèse, article en cours de préparation, non encore terminé et soumis.

3.2 Article 3

Development and validation of a new dynamic *in vitro* model of the piglet colon (PigutIVM): application to the study of probiotics.

Mickaël Fleury^{1,2,3,α}, Olivier Le Goff^{1,α}, Sylvain Denis¹, Frédérique Chaucheyras-Durand⁴, Eric Jouy^{2,3}, Isabelle Kempf^{2,3}, Stéphanie Blanquet-Diot^{1,*}, Monique Alric^{1,*}

¹ Clermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, EA 4678 CIDAM, Conception Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, Clermont-Ferrand, France.

² ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Ploufragan, France.

³ Université Européenne de Bretagne, Rennes, France.

⁴ INRA, UMR1213 Herbivores, Theix, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France.

^α These authors contributed equally to this work.

^{*} Co-senior authors.

Corresponding author: Stéphanie Blanquet-Diot; Mailing address: CBRV, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand; E-mail: stephanie.blanquet@udamail.fr; Tel.: (+33) 4 73 17 83 90, Fax: (+33) 4 73 17 83 92

Introduction

The colon of mammalian such as pig is inhabited by a large variety of microbial communities with is known to have a major influence on the host. Pig gut microbiota is widely influenced by internal and external factors, including (i) diet which is a major factor driving the composition and metabolism of colonic microbiota (Loh et al., 2006), (ii) life stage such as post-weaning phase where microbial disturbance are observed (Hopwood and Hampson, 2003; Rose et al., 2003), (ii) and antibiotics, which remain largely used during critical phase of pig farming such as post-weaning, even if their use as growth promoters was banned since 2006. These factors in turn widely impact the overall growth and health status of the animals (such as their susceptibility to enteric pathogens). It is therefore particularly important to investigate the effect of dietary compounds (feed ingredients or additives) or medication (mainly antibiotics) on the pig and piglet microbiome and better understand the associated mechanisms. Among feed additives, probiotics are frequently used to improve growth performance and intestinal microbial balance, limiting pathogenic implantation in the gut (Chaucheyras-Durand and Durand, 2010).

Such kind of studies can ideally be carried out in the animals but this approach remains restricted by its high cost, the need of appropriate qualified personnel and dedicated infrastructures and by ethical concerns. Indeed, in line with European regulation, it seems nowadays crucial to avoid animal studies as often as possible and prioritize *in vitro* approaches (Parliament and the Council of the European Union, 2010). Compared to *in vivo* assays, such *in vitro* techniques can save labor and time, offer flexibility and allow a good reproducibility between experiments due to standardized conditions, getting rid of inter or intra individual variability.

Most of *in vitro* models that have been developed to date to reproduce the pig colon are simple batch systems (Awati et al., 2006; Bindelle et al., 2011). Such models are largely used to study the fermentation capacity of various substrates by gut microbial owing to their low cost and easy use. Nevertheless, batch cultures are limited by substrate depletion which restricts the

operational time of fermentation to several hours, continuous change in pH and redox potential and weakness in microbiological control (Payne et al., 2012). Alternatively, semi-continuous or continuous fermentation models may be used for a better simulation of dynamic phenomena occurring within the pig colonic environment, as they integrate essential digestive parameters such as realistic transit time and supply of simulated ileal effluents. By maintaining optimal growth conditions for microbial population, such kind of models allows long term experimental periods (until several months).

Few semi-continuous or continuous *in vitro* model of the pig or swine colon have been developed (Pinloche et al., 2012; Tanner et al., 2014) but to date no one reproduces the conditions found in the piglet gut colon. Nevertheless, having such a tool would be of high interest because the first weeks of life are the critical phase in the growing cycle of pigs. In addition, despite their complexity, none of the current models reproduce the physiologically anaerobic conditions of the pig gut. Indeed the anaerobic atmosphere of the reactors is always maintained by a continuous flux of N₂ or CO₂ and is not kept by sole fermentative activity of the microbiota as occurred *in vivo*.

The aim of the present study is to introduce a new continuous *in vitro* model of the piglet colon untitled PigutIVM. Based on *in vivo* data, this model reproduces the main parameters of the piglet colonic environment, namely pH, retention time, supply of ileal effluent, presence of a complex and metabolically active microbiota and anaerobiosis self-maintained by microbial fermentations. This model was validated by comparison with *in vivo* data with respect to gut microbial composition and activity, both in control conditions and when colistin, an antibiotic widely used to treat piglet colibacillosis diarrhea, was administered. Lastly, as an example of the potential applications of the model, the effect of a probiotic feed additive on piglet gut microbiome was assessed.

Materials and methods

Test compounds

The widely used antibiotic colistine was used at a field dosage for *in vitro* (Colivet solution, CEVA, Libourne, France) and *in vivo* (Concentrat VO 49-2 Colistine 200 SOGEVAL, Laval, France) experiments. *Saccharomyces cerevisiae* spp *boulardii* CNCM I-1079 (Levucell[®]SB) was obtained from Lallemand animal nutrition (Toulouse, France) in its active dried powder form.

Fecal collection and treatment for *in vitro* assays

Fecal samples from eight weeks old specific pathogen free (SPF) piglets with no history of antibiotic treatment were collected in sterile bottles. Anaerobiosis was maintained using anaerobic gas pack systems (GENbag anaer, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) during transport to the laboratory. Fecal samples were then stored at -80°C until treatment. Piglet feces from eight animals (150 g) were pooled and mixed with 1200 mL of 200 mM sodium phosphate and filtered through a double layer of gauze. The fecal suspension was used to inoculate three bioreactors that will run in parallel (400 mL by reactor).

In vitro piglet colonic model (PigutIVM)

A stirred tank 2-L bioreactor (GPC - Global Process Concept Inc., Périgny, France) equipped with various ports and probes was used in continuous conditions to simulate the piglet colonic environment (Figure 1). This *in vitro* model integrates according to *in vivo* data the main parameters of the piglet colon: temperature, pH, anaerobiosis, supply of simulated ileal effluents and presence of a complex, high-density, metabolically active microbiota. The temperature of the fermentative medium is maintained at 39°C by the circulation of hot water inside a double glass wall. The bioreactor is equipped with a pH sensor (Inpro[®] 3253i/SG/225 probe, Mettler Toledo, Viroflay, France) to continuously monitor the pH and adjust it accordingly with automatic addition of 2M NaOH. The oxido-reduction potential is monitored every 5 min using

an Argenthal reference probe (Inpro[®] 3253i/SG/225 probe, Mettler Toledo, Viroflay, France). Measured redox potentials E are corrected into an E_h value by adding 197 mV to the recorded values. Anaerobiosis inside the fermentor is maintained by the only activity of the microbiota, without flushing with N_2 or CO_2 .

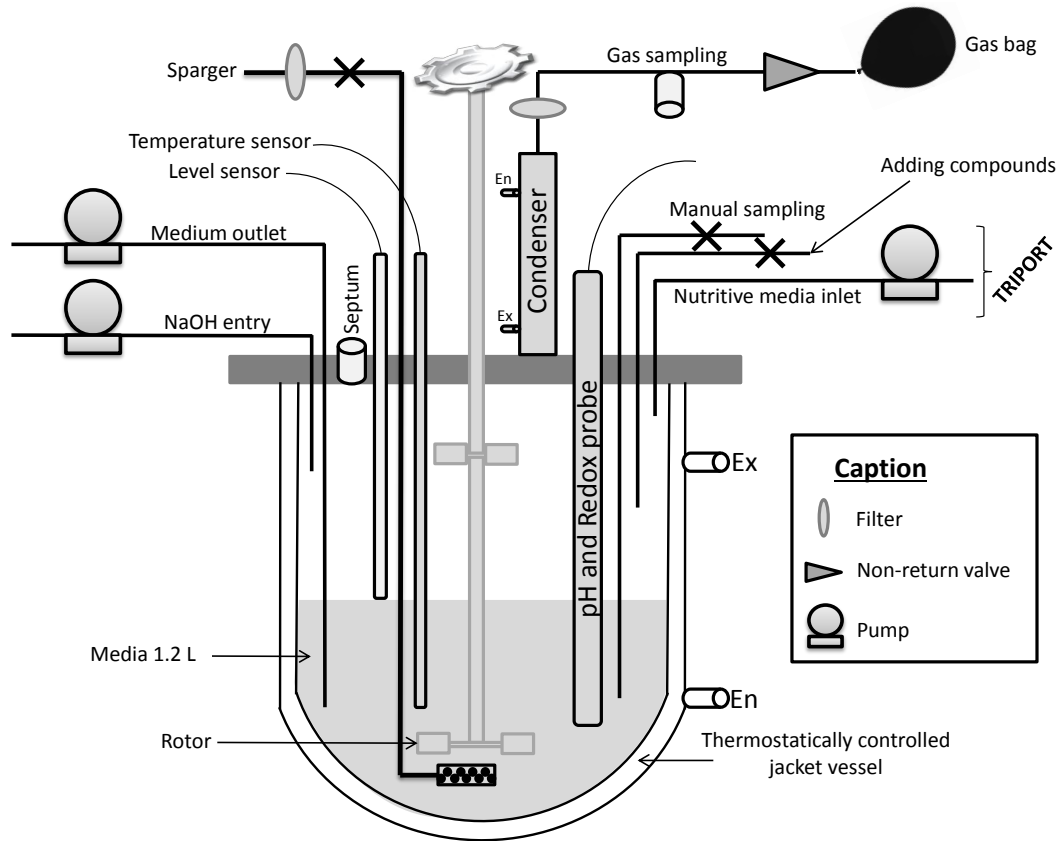


Figure 1: Schematic representation of the tank and connections.

A nutritive medium containing various carbohydrate, protein, lipid, mineral and vitamin sources is continuously introduced into the bioreactor (Table 1). Its composition has been designed to closely mimic the ileal chyme of piglet. The volume inside the bioreactor is monitored by a level sensor and maintained at a constant value by regular withdraw of the colonic medium. The fermentative medium and the atmospheric phase were continuously stirred (400 rpm) with impeller and samples can be collected from the two phases.

Table 1: Composition of the nutritive media for PigGutIVM fermentation

Compounds		
Carbohydrates		
Starch	5	g.L ⁻¹
Mucin type II	4	g.L ⁻¹
Arabinogalactan	2	g.L ⁻¹
Cellulosis	2	g.L ⁻¹
Pectin	2	g.L ⁻¹
Xylan	2	g.L ⁻¹
Guar gum	1	g.L ⁻¹
Inulin	1	g.L ⁻¹
Proteins		
Soy peptone	8	g.L ⁻¹
Tryptone	5	g.L ⁻¹
Yeast extract	4.5	g.L ⁻¹
Cystein	500	mg.L ⁻¹
Lipids		
Tween 80	1	g.L ⁻¹
Soy lecithin	400	mg.L ⁻¹
Bile salts	200	mg.L ⁻¹
Minerals and vitamins		
KCl	4.5	g.L ⁻¹
NaCl	4.5	g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	600	mg.L ⁻¹
NaHCO ₃	420	mg.L ⁻¹
MnCl ₂ , 4H ₂ O	200	mg.L ⁻¹
MgSO ₄ , 7H ₂ O	15	mg.L ⁻¹
CaCl ₂ , 2H ₂ O	15	mg.L ⁻¹
FeSO ₄ , 7H ₂ O	5	mg.L ⁻¹
Hemin	5	mg.L ⁻¹
Panthothenic acid	10	μg.L ⁻¹
Nicotinamid	5	μg.L ⁻¹
Aminobenzoic acid	5	μg.L ⁻¹
Thiamin	4	μg.L ⁻¹
Menadione	1	μg.L ⁻¹
D-biotin	2	μg.L ⁻¹
Vitamin B12	0.5	μg.L ⁻¹

Fermentation procedure

The fecal suspensions were rapidly transferred to the bioreactors previously flushed with O₂-free N₂ gas and brought to 800 mL with nutritive medium. Three fermentations were carried out in the same time from a single inoculum. The *in vitro* model was run under average conditions of the piglet colon with a temperature maintained at 39 °C, a constant pH of 6.2, a volume

of 1.2 L and a mean retention time of 24 h. All parameters used for *in vitro* fermentations are summarized in Figure 2. The continuous fermentations were carried out for 28 days and treatments began after a 7 days stabilization phase. Three experimental schemes were used (Figure 2): 1- control assay without treatment (NT), 2- a twice daily supplementation with *S. boulardii* CNCM I-1079 (109 CFU per day) during the treatment and recovery phases (Sb), 3- a regular supply of colistin within the nutritive medium at the level of 3 160 000 IU/day during the 14 days treatment phase (COL).

Samples were daily collected from the fermentative medium and stored at -20°C until analysis. Anaerobic conditions were regularly checked during the experimentation by off-gas analysis (O_2 , CO_2 , CH_4 , H_2) using gas chromatography coupled with a FID detector (HP 6890 series columns: Molecular Sieve 5A and Porapack Q, Agilent technologies, ville, USA).

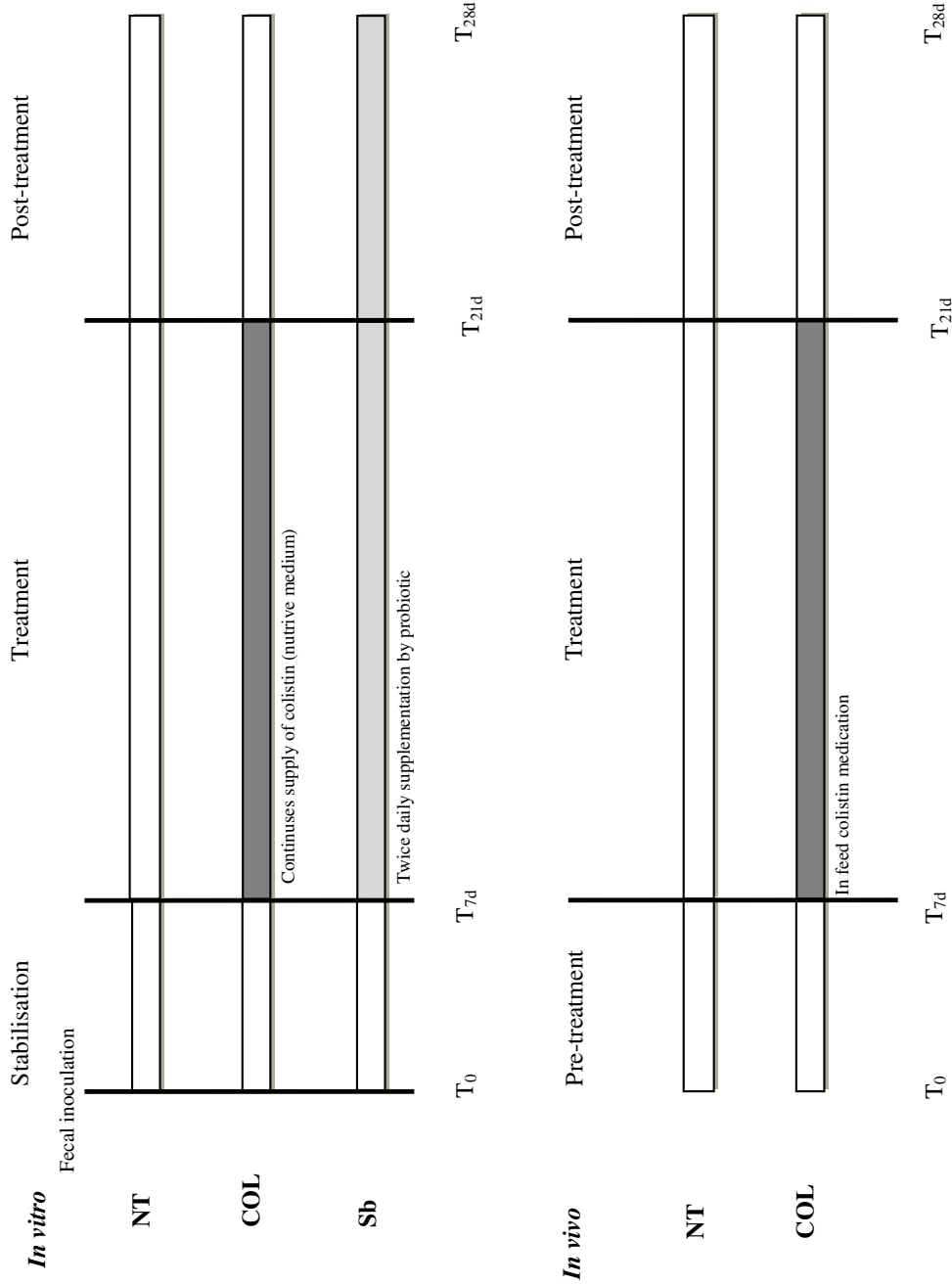


Figure 2: Time schedule of the PigGutIVM model and *in vivo* experimentation.
In vitro, Samples were daily collected whereas for the *in vivo*, samples were realised the days :0, 3, 14 and 24
 NT : Control fermentor; COL: colistin fermentor and Sb: probiotic fermentor

In vivo experiments with colistin

The experiments were performed in the piggeries of the ANSES Ploufragan, North-West France, in accordance with the French animal welfare regulations and the protocol was approved by the ComEth ANSES/ENVA/UPEC ethical committee (authorization 14/02/12-3). Eight weeks old SPF piglets were treated by receiving an in-feed colistin medication at the field dosage of 3600 IU/gram of feed. The commercial medicated feed was given *ad libitum* during two weeks ($n = 8$) and the same non-supplemented commercial feed was offered to the control animal group ($n = 8$). One week recovery period was observed for the two groups after the treatment. Fecal samples were regularly collected throughout the experiment from treated and control animals and stored at -80°C under anaerobiosis until analysis. Colonic pH and body temperature were measured in the non-treated animals ($n=4$).

Fermentative metabolites analysis

Under investigation.

DNA extraction and qPCR analysis

Total DNA was extracted from 0.2 g of individual fecal samples or from 1mL of fermentative medium using the previously described protocol (Yu et Morisson, 2004) followed by Qiagen's Fast DNA stool kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The same protocol was used to prepare standard curves for qPCR analysis. DNA extracts were stored at -20°C until analysis. Each sample was adjusted to a concentration of $10\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$ before performing quantitative real time PCR (qPCR) for enumeration of specific bacterial population including total bacteria, *Bacteroides* / *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *E. coli*, *Enterococcus* and *Lactobacillus* / *Leuconostoc* / *Pediococcus*. Briefly, PCR reactions were performed in a $10\text{ }\mu\text{L}$ final volume, containing $1\text{ }\mu\text{L}$ of diluted DNA sample, $0.2\text{ }\mu\text{M}$ of each primer, $0.25\text{ }\mu\text{M}$ of TaqMan[®] probe and 1X of IQ Supermix (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) or IQ SYBR-Green (Bio-Rad). The *E. coli* qPCR used a concentration of $0.3\text{ }\mu\text{M}$ of each primer and $0.1\text{ }\mu\text{M}$ of probe. The amplification

program was composed of an initial denaturation of 95 °C for 10 min., 40 cycles of 95 °C for 30s and 60 °C for 60s, and a final melting-curve for SYBR-Green tests. Results were expressed in \log_{10} copies of 16S rRNA genes per g of fecal material or per mL of fermentative content.

Illumina pyrosequencing

Under investigation

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R 3.0.0 (R Core Team, 2013) using the stats package. qPCR data were \log_{10} -transform and expressed as means \pm standard deviation for the different phases. Pearson correlation analyses tested the linear relationship between two sets of data (*in vitro* and *in vivo*). A non-parametric Mann-Whitney test was performed to ensure that the three conditions were similar or not. For all tests, values of $p < 0.05$ were considered statistically significant differences.

Results and Discussion

Set-up of the new *in vitro* model PigutIVM

The new PigutIVM model described in this paper integrates the main parameters of the piglet colonic environment. These parameters have been implemented in the model based on a literature review or on *in vivo* measurements performed in the present study. The fermentations were run at a constant pH of 6.2 and temperature was maintained at 39 °C according to *in vivo* measurements in the piglet colon. The retention time was fixed at 24h and the volume at 1200 mL, as they have been previously described as the mean colonic transit time and volume in piglets (Davis et al., 2001; Ueda et al., 2006; Saraoui et al., 2013). The oxidation/reduction potential was measured (but not controlled) during *in vitro* fermentations (non-treated conditions) and a mean value of -288 mV was found. This result is totally consistent with *in vivo*

measurements in piglets where a value of -283.5 ± 23 mV (n=4) was obtained. Such low values are in accordance with anaerobic conditions which characterize pig colonic environment. Gas analysis of the bioreactor atmospheric phase showed high percentages of H₂ and CO₂ and, no detectable O₂ (Table 2). These results showed that an anoxic environment was successfully maintained in the PigutIVM model without flushing with CO₂ or N₂ as it is usually done in the other models, leading to more realistic conditions compared to the in vivo situation.

Table 2: Mean concentration and standard deviation of CH₄, CO₂ and H₂ for the different phases for each reactor (in percentage). p: pvalue was indicated by letters

Reactor	CH ₄					CO ₂					H ₂					
	Stabilisation	p	Treatment	p	Post-treatment	p	Stabilisation	p	Treatment	p	Post-treatment	p	Treatment	p	Post-treatment	p
NT	0	0	4.1	4.6	10.6	0.7	50	17.8	52.2	5.6	56.4	3.2	1.2	1.7	0.6	0.2
COL	0	0	a	0.1	0.2	c	50.4	19.6	51.2	8.2	59.9	3.2	b	2.2	0.7	0.6
Sb	0.1	0.1	d	1.7	7.3	e	50.7	19	50	6.7	55.7	5	1.1	1.8	0.7	0.2

pvalue for NT vs COL: a=0.05; b=0.01 and c=0.001
pvalue for NT vs Sb: d=0.05 and e=0.001

Furthermore, the composition of the nutritive medium which is continuously supplied to the bioreactor was adapted from that described by MacFarlane et al. in human (Macfarlane et al., 1998) and Gerard-Champod et al. (Gérard-Champod et al., 2010) in pre-ruminant calves, to more closely mimic the piglet ileal effluents (Table 1). In particular, proteins of animal origin have been replaced by vegetal protein (soy peptone at a concentration of 8 g L⁻¹). Once the model adapted to piglet conditions, fermentations were carried out to optimize fermentation parameters and get closer to the *in vivo* situation with respect to the levels of the main bacterial populations. The time required for the stabilization phase was thus increased from 5 days (a five retention time stabilization phase is classically used in continuous fermentation model) to 7 days to allow the stabilization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations. Increasing amounts of fecal inoculums were also tested to obtain bacterial stabilization at sufficiently high levels.

Validation of the model against *in vivo* data in piglets

Once the model developed and optimized, the next phase was dedicated to its validation against *in vivo* data in piglets regarding the composition and metabolic activity of the gut microbiota. *In vitro* and *in vivo* data were compared both under untreated conditions and when an antibiotic treatment is applied. Here, the objective is to assess the relevance of our *in vitro* model when normal (“normobiosis”) or disturbed conditions (“dysbiosis”) are reproduced. When no antibiotic treatment was applied, at the end of the stabilization phase *in vitro*, the main bacterial populations were stabilized at levels closed to that observed *in vivo* in the piglet feces (Table 3 and Suppl data 1).

Table 3: Mean concentration (\log_{10} 16Sr RNA gene copies.g⁻¹ colonic medium) of specific bacterial groups quantified by qPCR from NT, COL and Sb during the different phases. *Lact./Ped.* for *Lactobacillus/Pediococcus/Leuconostoc*; p: pvalue was indicated by letters.

Reactor	total bacteria			<i>Bacteroides/Prevotella</i>			<i>Bifidobacterium</i>																
	Stab.	p	Treat.	p	Post-treat.	p	Stab.	p	Treat.	p	Post-treat.	p											
NT	12,72	0,29	12,59	0,38	12,74	0,34	12,60	0,32	12,42	0,23	12,45	0,11	9,53	1,55	6,64	1,01	8,49	0,91					
COL	12,82	0,77	12,29	0,35	12,55	0,23	12,32	0,60	11,58	0,63	11,81	0,25	a	10,05	1,19	8,98	0,59	b	8,86	0,35			
Sb	13,32	0,53	c	13,03	0,56	d	12,84	0,25	12,38	0,26	12,72	0,14	d	9,79	1,14	7,72	1,48		7,86	1,11			
Reactor	<i>Enterococcus</i>			<i>Lact./Ped./Leuc.</i>			<i>E. coli</i>																
	Stab.	p	Treat.	p	Post-treat.	p	Stab.	p	Treat.	p	Post-treat.	p	Stab.	p	Treat.	p	Post-treat.	p					
NT	10,33	0,97	9,57	1,17	11,43	0,16	10,55	1,42	8,14	0,68	9,32	0,48	10,61	0,44	10,53	0,34	10,70	0,21					
COL	10,19	1,03	9,97	0,49	10,46	0,27	a	11,31	1,33	11,20	0,96	b	11,94	0,41	b	6,73	1,51	b	5,82	0,29	b		
Sb	10,92	0,25	10,84	0,27	d	11,58	0,16	11,10	1,28	9,42	0,81	e	10,35	1,10	c	9,97	0,96	6,49	1,14	e	5,84	0,48	e

Stab.: Stabilisation, Treat.: Treatment and Post-treat.: Post-Treatment
pvalue for NT vs COL:a=0.01 and b=0.001
pvalue for NT vs Sb: c=0.05, d=0.01 and e=0.001

The correlation coefficients between *in vitro* and *in vivo* data (Table 4) were higher than 0.95 for all the populations studied (except for *Bacteroides* with a coefficient of 0.63), showing the relevance of our *in vitro* model in mimicking the *in vivo* situations. The low correlation coefficient obtained for *Bacteroides* may be explained by the fact that this population was stabilized *in vitro* at a higher level than *in vivo* (12.5 Log₁₀ versus 9.5 Log₁₀). Anaerobic conditions found in the *in vitro* system are certainly more favorable to the development of *Bacteroides* than microaerophilic conditions encountered in fecal samples (Van den Abbeele et al., 2010). Bacterial levels found *in vivo* in the present study are closed to that previously found by other authors showing that SPF pigs have a representative and similar gut microbiota as pigs of farm animals (Furet et al., 2009). Then, subsequently, *in vitro* and *in vivo* data were compared when an antibiotic treatment with colistin was applied. Colistin is one of the most frequently used antibiotic in pig farming, mainly for the treatment of digestive trouble associated with the post-weaning phase (Kempf et al., 2014). *In vivo*, the addition of colistin had no effect on total bacteria, *Bacteroides/Prevotella*, *Bifidobacterium* and *Enterococcus* but led to a significant increase in the level of *Lactococcus/Pediococcus/Leuconostoc* (p<0.001).

Interestingly, a significant decrease (p<0.001) in the level of *E. coli* was also noticed, with a reduction of approx. 2 Log₁₀ (6.0 ± 0.6 versus 7.9 ± 0.5 Log₁₀) (Suppl data 1). This diminution was observed as soon as three days after the beginning of treatment and remained stable throughout the treatment phase (Figure 3). During post-treatment, *E. coli* population increased to reach initial level of the pre-treatment phase (Figure 3). As previously shown *in vivo*, colistin treatment did not modify *in vitro* the levels of total bacteria and *Enterococcus* but led to a significant increase in *Lactobacillus/Pediococcus/Leuconostoc* (from 8.1 ± 0.7 Log₁₀ to 11.2 ± 1.0, p<0.001). It also led, in accordance with *in vivo* results, to a significant reduction in *E. coli* population (p<0.001) which decreased from 7.9 ± 0.5 Log₁₀ to 6.0 ± 0.6 (p<0.001) since the second day of treatment. Unlike what was observed *in vivo*, in the post-

treatment phase, the initial level of *E. coli* was not recovered *in vitro* (Figure 3). This difference may be explained by the fact that, unlike in the *in vivo* situation, (i) there is no mucosal phase in the *in vitro* model which serves *in vivo* as a reservoir for *E. coli* populations (ref) and (ii) the nutritive medium supplied *in vitro*, but not the pig feed, is sterile.

In addition, *Bifidobacterium* and *Bacteroides/Prevotella* which were stable in the pig significantly increased *in vitro* when the antibiotic treatment was administered ($p < 0.001$). The reduction in *E. coli* levels associated with colistin treatment certainly led to the opening of an ecological niche favorable to the growth of other microbial populations such as *Bifidobacterium* or *Bacteroides/Prevotella*.

In any event, the correlation coefficients between *in vitro* and *in vivo* data obtained for the different bacterial populations during the treatment phase with colistin were around 0.9 (Table 4). This shows the predictability of the new *in vitro* model when microbial disturbance are reproduced (Table 4).

Regarding the effects of colistin on gut microbiota activity, the CO_2 and H_2 production was significantly higher in the post-treatment phase when colistin was added compared to non-treated conditions. The CH_4 production increased during all the fermentation experiments for control conditions and when the probiotic strain was added, whereas there was no CH_4 production during the treatment and post-treatment period when colistin was added. These results suggest that colistin may have an impact on *Archaea* methanogens.

Table 4: Pearson correlation between *in vivo* and *in vitro*. For NT, the correlation was established throughout the period, whereas for the COL, only during the treatment phase.

		<i>In vivo</i>				
		Total bacteria	<i>Bacteroides</i> / <i>Prevotella</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lact/Ped/Leuc</i> <i>E. coli</i>
<i>In vitro</i>	Total bacteria	0.96 / 0.90				
	<i>Bacteroides</i> / <i>Prevotella</i>		0.63 / 0.89			
	<i>Bifidobacterium</i>			0.96 / 0.93		
	<i>Enterococcus</i>				0.97 / 0.93	
	<i>Lact/Leuc/Pedi</i> <i>E. coli</i>					0.95 / 0.92 0.96 / 0.88

NT / COL

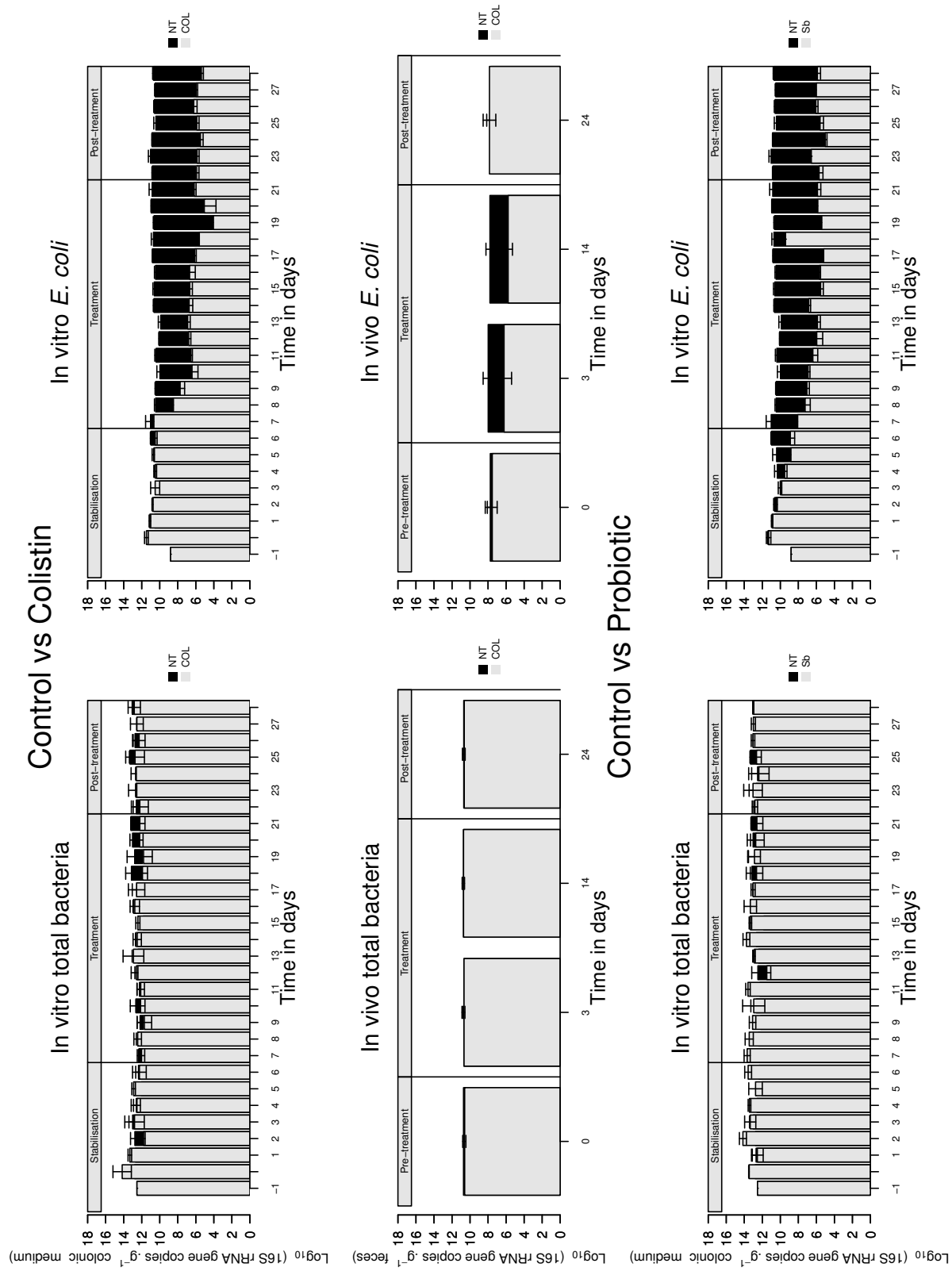


Figure 3: Comparison between control (black) vs Colitin (gray) *in vitro* and *in vivo* during the different phases for total bacteria and *E. coli* or control vs probiotic only *in vitro*. Mean concentration (log10 16Sr RNA gene copies.g⁻¹ colonic medium or feces). On *in vitro* plot, the time -1 corresponding to the concentration in the feces between inoculation.

Application to the evaluation of probiotic effect on piglet microbiome

Once the new PigutIVM validated, the last aim of the present study was to use it in order to assess the effect of a feed additive on the piglet microbiome. The removal of antibiotic as growth promoters in the animal feed as well as the alarming increase in antimicrobial resistance world-wide (ref) has led to the need to find alternative strategies to antibiotics in order to maintain pig growth and health. Among them, probiotics, which are defined as “live microorganisms which when administered in adequate amount confer a health benefit on the host” (FAO/WHO, 2001), appear as one of the most relevant alternative compounds. We therefore study in the PigutIVM the influence of the probiotic strain *Saccharomyces boulardii* CNCM I-1079 (Levucell®SB) on the piglet microbiota composition and functionality. This probiotic is already authorized as feed additive in piglets and sows. The twice daily supplementation by the probiotic led to significant modifications of the gut microbiota profiles (Table 3, Figure 3 3). A significant increase (around 1 Log₁₀, p<0.05) in *Enterococcus* and *Lactococcus/Pediococcus/Leuconostoc* levels was observed while *E. coli* population significantly (p<0.001) decreased of more than 4 Log₁₀ (from 10.5 ± 0.3 to 6.5 ± 1.1 Log₁₀ in the treatment phase and from 10.7 ± 0.2 to 5.8 ± 0.5 Log₁₀ in the post-treatment phase). This means that the probiotic treatment has the same effect on the reduction of *E. coli* population than the antibiotic treatment with colistin.

Discussion and conclusion will be done when all data will be available

References

- Awati, A., Williams, B., Bosch, M., Li, Y., and Verstegen, M. (2006). Use of the *in vitro* cumulative gas production technique for pigs: An examination of alterations in fermentation products and substrate losses at various time points. *Journal of animal science*, 84(5):1110–1118.
- Bindelle, J., Pieper, R., Montoya, C. A., Van Kessel, A. G., and Leterme, P. (2011). Non-starch polysaccharide-degrading enzymes alter the microbial community and the fermentation patterns of barley cultivars and wheat products in an *in vitro* model of the porcine gastrointestinal tract. *FEMS microbiology ecology*, 76(3):553–563.
- Chaucheyras-Durand, F. and Durand, H. (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial microbes*, 1(1):3–9.
- Davis, S., Illum, L., and Hinchcliffe, M. (2001). Gastrointestinal transit of dosage forms in the pig. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 53(1):33–39.
- FAO/WHO, J. (2001). WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Córdoba, Argentina. October*, pages 1–4.
- Furet, J.-P., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., Doré, J., and Corthier, G. (2009). Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS microbiology ecology*, 68(3):351–362.
- Gérard-Champod, M., Blanquet-Diot, S., Cardot, J.-M., Bravo, D., and Alric, M. (2010). Development and validation of a continuous *in vitro* system reproducing some biotic and abiotic factors of the veal calf intestine. *Applied and environmental microbiology*, 76(16):5592–5600.

- Hopwood, D. and Hampson, D. (2003). Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period. *Weaning the Pig: Concepts and Consequences. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers*, pages 199–212.
- Kempf, I., Jouy, E., Granier, S., and Bruneau, M. (2014). L’antibiorésistance des bactéries isolées chez le porc (première partie). *Le nouveau praticien vétérinaire, élevages et santé*, 6:189–194.
- Loh, G., Eberhard, M., Brunner, R. M., Hennig, U., Kuhla, S., Kleessen, B., and Metges, C. C. (2006). Inulin alters the intestinal microbiota and short-chain fatty acid concentrations in growing pigs regardless of their basal diet. *The Journal of nutrition*, 136(5):1198–1202.
- Macfarlane, G., Macfarlane, S., and Gibson, G. (1998). Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microbial Ecology*, 35(2):180–187.
- Parliament, E.-U. and the Council of the European Union (2010). Directive 2010/63/(eu) of the european parliament and of the council of 22 september 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official J Eur Union*, 276.
- Payne, A. N., Zihler, A., Chassard, C., and Lacroix, C. (2012). Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends in biotechnology*, 30(1):17–25.
- Pinloche, E., Williams, M., D’Inca, R., Auclair, E., and Newbold, C. (2012). Use of a colon simulation technique to assess the effect of live yeast on fermentation parameters and microbiota of the colon of pig. *Journal of animal science*, 90(Supplement 4):353–355.
- R Core Team (2013). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

- Rose, N., Larour, G., Le Diguerher, G., Eveno, E., Jolly, J., Blanchard, P., Oger, A., Le Dimna, M., Jestin, A., and Madec, F. (2003). Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (pmws) in 149 french farrow-to-finish herds. *Preventive veterinary medicine*, 61(3):209–225.
- Saraoui, T., Parayre, S., Guernec, G., Loux, V., Montfort, J., Le Cam, A., Boudry, G., Jan, G., and Falentin, H. (2013). A unique *in vivo* experimental approach reveals metabolic adaptation of the probiotic *Propionibacterium freudenreichii* to the colon environment. *BMC genomics*, 14(1):911.
- Tanner, S. A., Berner, A. Z., Rigozzi, E., Grattepanche, F., Chassard, C., and Lacroix, C. (2014). *In vitro* continuous fermentation model (polyferms) of the swine proximal colon for simultaneous testing on the same gut microbiota. *PloS one*, 9(4):e94123.
- Ueda, K., Matteotti, R., Assalia, A., and Gagner, M. (2006). Comparative evaluation of gastrointestinal transit and immune response between laparoscopic and open gastrectomy in a porcine model. *Journal of gastrointestinal surgery*, 10(1):39–45.
- Van den Abbeele, P., Grootaert, C., Marzorati, M., Possemiers, S., Verstraete, W., Gérard, P., Rabot, S., Bruneau, A., El Aidy, S., Derrien, M., Zoetendal, E., Kleerebezem, M., Smidt, H., and Van de Wiele, T. (2010). Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for *Bacteroidetes* and *Clostridium* cluster ix. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15):5237–5246.

3.3 Discussion / Perspectives

Le nouveau système continu, nommé « PigutIVM », a permis, dans ces premières expériences, de simuler le microbiote colique du porcelet sur une durée de 28 jours. Une étape de stabilisation de 7 jours a conduit à un état d'équilibre identique sur 3 fermenteurs différents ayant été ensemencés à partir du même inoculum initial. Dans les cuves témoins, cet état d'équilibre est conservée sur toute la durée des essais mais il est envisageable de poursuivre de telles expérimentations sur des durées plus longues.

Les mesures de gaz ont montré que l'anaérobiose était bien conservée tout au long de l'essai. Le potentiel d'oxydo-réduction mesuré *in vitro* est très proche de celui mesuré sur les porcs autopsiés, ce qui augure de capacités de dégradation similaires *in vitro* à celles observées *in vivo*.

Les valeurs de pH, de température et de temps de transit, introduites dans ce modèle, ont permis d'obtenir un profil *in vitro* des principales populations ciblées du microbiote similaire non seulement à celui observé *in vivo* sur les porcelets EOPS mais aussi à celui décrit dans d'autres études scientifiques (Furet et al., 2009). En effet, une corrélation issue des témoins, entre porcelets EOPS et modèle *in vitro*, est observée, à plus de 95%, pour les bactéries totales, *E. coli*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* et *Enterococcus*.

Afin de confirmer ces résultats et d'apporter de nouveaux éléments, une analyse plus fine de l'écosystème microbien par pyroséquençage a été programmée sur un certain nombre d'échantillons *in vivo* et *in vitro* (témoin, traitement colistine forte dose, traitement probiotique) et elle est actuellement en cours.

L'analyse des AGCC est aussi en cours de traitement, elle devrait, elle aussi, apporter des informations complémentaires sur l'activité métabolique du microbiote implanté dans ce modèle « PigutIVM » et de ce fait, des éléments pour discuter de la pertinence de ce nouveau modèle. Les résultats seront incorporés à la publication ci-dessus.

Les résultats comparatifs obtenus dans ce modèle « PigutIVM », dans les deux conditions « normobiose » et « dysbiose », sont en parfaite cohérence avec ceux obtenus *in vivo*. De plus, cet outil, dans des conditions standardisées et identiques, nous a aussi permis de démontrer que les deux stratégies, antibiotique et probiotique, conduisaient à des impacts similaires à la fois sur la population bactérienne totale et sur les *E. coli*. L'utilisation de ce modèle pour évaluer l'impact du probiotique, *Saccharomyces cerevisiae* spp. *boulardii* est fort encourageante puisque les résultats préliminaires obtenus dans ce modèle confortent les résultats de la littérature (Chaucheyras-Durand and Durand, 2010; Price et al., 2010; Cho et al., 2011) préconisant l'administration de ce probiotique pour améliorer la santé de l'hôte. Ceci positionne donc notre modèle comme un outil de prédiction qui devrait être particulièrement utile pour analyser de nouvelles stratégies alternatives aux antibiotiques. Ceci étant, dans l'état actuel du développement du modèle, seul l'environnement luminal est modélisé. Afin de pouvoir mieux comparer des données *in vitro* à des données *in vivo*, il serait particulièrement pertinent de rajouter une phase mucoale dans ce modèle *in vitro* (module HMI, Marzorati et al. (2014)).

A ce stade, même si l'ensemble de nos résultats est en faveur de la pertinence de notre nouveau modèle « PigutIVM », l'avancée de nos travaux et le traitement non terminé des derniers résultats nous limitent encore dans l'analyse et la discussion de ces derniers et donc de l'article en préparation ci-dessus. De plus, le faible nombre de modèles coliques porcins semi-continus ou continus existants à ce jour (Pinloche et al., 2012; Tanner et al., 2014a,b) limitera aussi la discussion générale sur le positionnement de notre outil dans le domaine dynamique de la fermentation colique *in vitro*.

Soulignons que, dans le cadre d'un stage post-doctoral, il est programmé d'adapter ce modèle *in vitro* à un état de dysbiose chez le porcelet en période de post-sevrage. De nouvelles comparaisons *in vitro/in vivo* pourront être réalisées et elles devraient apporter des éléments nouveaux pour la validation de cet outil. Dans ce contexte, seront aussi testées de nouvelles stratégies alternatives aux antibiotiques, et en particulier d'administration de probiotiques, lesquelles devraient aussi conforter tout l'intérêt à la fois de cet outil comme outil de prédiction et des probiotiques comme alternatives aux antibiotiques.

Enfin, le champ d'utilisation du modèle « PigutIVM » ne devrait pas se limiter à l'apport de connaissances dans le domaine des antibiotiques et de la résistance de bactéries à ces antibiotiques ou encore dans celui de l'évaluation de stratégies alternatives aux antibiotiques. En effet, il ouvre des perspectives bien plus larges dans l'ensemble des domaines nutritionnels et pharmacologiques pour l'évaluation d'additifs alimentaires variés (probiotiques, prébiotiques, nutraceutiques, enzymes, acides organiques, minéraux, immunoglobulines...) dont l'efficacité et le potentiel de développement (Pluske, 2013) restent encore à démontrer.

Conclusion générale et perspectives

La première partie du travail réalisé au cours de cette thèse a permis d'évaluer l'impact de deux traitements antibiotiques (colistine et ceftiofur) sur le microbiote intestinal du porcelet lors d'études *in vivo*. Lors de ces essais, il a été observé que les deux molécules antibiotiques testées avaient peu d'impact sur le microbiote intestinal, à la fois sur sa diversité (résultats qPCR) et son activité métabolique (analyse des AGCC produits par les bactéries présentes dans le côlon terminal de l'animal). Les essais de traitement à la colistine et au ceftiofur ont été réalisés sur des animaux EOPS, porcelets ayant une « flore normale » au niveau de leur tractus gastro-intestinal. Il serait bien entendu intéressant de confirmer ou non l'impact de ces antibiotiques sur des animaux ayant les pathologies respectives nécessitant ces traitements antibiotiques (respectivement diarrhées de post-sevrage et pathologies pulmonaires). Dans une logique d'étude de l'antibiorésistance, les essais réalisés chez l'animal ont cherché à évaluer la sélection de souches résistantes dans le microbiote lors de l'administration de ces deux antibiotiques (colistine et ceftiofur).

La deuxième partie du travail de thèse s'est focalisée sur le développement d'un modèle *in vitro* adapté à la fermentation colique du porcelet. Après mise en place et validation de cet outil par rapport à des données *in vivo* dans deux cas d'étude, normobiose et dysbiose (traitement à la colistine), il a été utilisé pour évaluer l'impact d'un probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur le microbiote intestinal du porcelet. Les résultats obtenus à la fois avec l'antibiotique et le probiotique sont très encourageants pour positionner cet outil comme un outil pertinent en terme de prédiction en amont de toute expérience chez l'animal.

Traitement antibiotique et mutations chromosomiques

Dans un premier temps, la colistine, antibiotique pour lequel les mécanismes de résistance connus sont chromosomiques, a été utilisée chez le porc, soit en sous-dosage, soit en surdosage. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas pu observer de sélection de souche de *E. coli* résistante. Pourtant, pour d'autres antibiotiques pour lesquels des mutations chromosomiques peuvent être responsables de la résistance, comme par exemple les fluoroquinolones, plusieurs publications rapportent la sélection de mutants résistants lors d'expérimentations réalisées en conditions protégées sur des nombres limités d'animaux ou en conditions terrain avec un suivi individuel des animaux.

Cette sélection de mutants résistants peut être enregistrée parmi les bactéries pathogènes ou commensales du tube digestif. Ainsi, des clones résistants de *Mycoplasma hyopneumoniae* émergent après administration de marbofloxacin à la dose thérapeutique ou à demi-dose : ces mutants résistants porteurs de diverses mutations apparaissent chez plusieurs animaux, résultant sans doute de différents événements mutationnels indépendants (Le Carrou et al., 2006).

Belloc et al. (2005) montrent que l'administration de fluméquine à des truies entraîne une augmentation transitoire des pourcentages de souches commensales de *E. coli* résistants aux

quinolones, avec une restauration de la flore après deux mois. Usui et al. (2014) observent une sélection rapide de *Campylobacter* résistants aux fluoroquinolones après l'administration d'enrofloxacin par voie intra-musculaire ou de norfloxacin par voie orale. Pour Delsol et al. (2004a), les souches résistantes de *Campylobacter* ont acquis une mutation dans les gènes cibles (gyrases) et persistent au moins 35 jours après traitement à la dose thérapeutique d'enrofloxacin.

Selon Wiuff et al. (2003), l'enrofloxacin à la dose recommandée sélectionne rapidement une flore coliforme résistante à l'enrofloxacin mais ces auteurs montrent également que, à la dose de 2,5 mg/kg, la sous-population de *Salmonelles* résistantes à l'acide nalidixique inoculée devient majoritaire, et que cette population de *Salmonelles* semble éradiquée par des doses plus élevées d'enrofloxacin, ce qui suggère l'absence d'émergence de souche résistante à plus haut niveau.

De même, dans l'expérimentation conduite par Delsol et al. (2004b) sur des porcs inoculés par des souches de *Salmonella typhimurium* résistantes à l'acide nalidixique, après consommation d'enrofloxacin à la dose thérapeutique, l'excrétion de *Salmonelles* est supérieure dans le lot traité comparé au lot non traité. Mais, les observations sur les animaux inoculés avec des souches sensibles ou résistantes montrent que, quelle que soit la sensibilité initiale des souches inoculées, les concentrations minimales inhibitrices de fluoroquinolones de *Salmonella* restent inchangées après traitement.

Il ressort de ces différents travaux que la probabilité d'émergence de populations bactériennes résistantes, du fait de mutations chromosomiques, dépend de différents facteurs tels que l'espèce, le genre bactérien, voire la souche bactérienne (Hänninen and Hannula, 2007; Ozawa and Asai, 2012) et l'antibiotique. Plus précisément, cela dépend non seulement du couple « espèce bactérienne-antibiotique » et de la fréquence de mutation correspondante, de la taille de la population bactérienne et de la concentration de l'antibiotique au niveau de la population cible (Ferran et al., 2013), mais aussi des conditions environnementales (Saint-Ruf and Matic, 2006; Kram and Finkel, 2014).

Dans le cadre de notre travail sur la colistine et le risque de sélection de souches résistantes, il serait intéressant d'évaluer *in vitro*, en milieu de culture, la fréquence de mutation conduisant à la résistance vis-à-vis de la colistine pour différentes souches porcines de *E. coli*. Ces analyses pourraient être menées dans diverses autres conditions expérimentales, afin d'évaluer l'adaptabilité des souches au stress bactérien lié à la présence d'antibiotiques en faibles concentrations (Rodríguez-Rojas et al., 2013) ou encore à différentes modifications (température, présence de sels biliaires, rareté des nutriments, pH, ...) susceptibles d'être rencontrées par la bactérie au sein du microbiote digestif de l'animal sain ou malade (Saint-Ruf and Matic, 2006).

Les souches utilisées pourraient être des souches commensales ou pathogènes, sensibles ou présentant déjà différentes résistances chromosomiques vis-à-vis d'autres familles d'antibiotiques, cette multi-résistance suggérant éventuellement un fort potentiel de mutation chez les souches dites hyper-mutatrices (Mao et al., 1997; Blázquez et al., 2012).

Des expériences de compétition *in vitro* entre souches sensibles et souches ou mutants iso-

géniques résistants présentant différents niveaux de résistance à la colistine pourraient être menées, en absence ou en présence de concentrations variables de colistine, afin de préciser les conditions favorisant l’augmentation de la population résistante et d’évaluer le coût biologique de la résistance à la colistine chez *E. coli*.

Ces études pourraient également être conduites pour d’autres bactéries cibles de la colistine telles que *Klebsiella pneumoniae* (Kieffer et al., 2014), *Acinetobacter baumannii* ou *Pseudomonas aeruginosa*.

Pour des études chez l’animal ou en fermenteur, comme proposé précédemment, compte tenu de l’impossibilité d’isoler spécifiquement les souches résistantes à partir de matières fécales, il pourrait être envisagé de recourir à l’inoculation de souches commensales de *E. coli* résistantes à la colistine et présentant un autre marqueur (résistance à la rifampicine par exemple ou caractère métabolique particulier) pour pouvoir analyser l’évolution de la population colibacillaire résistante à la colistine, selon différentes modalités de traitement.

A plus long terme, et sous réserve de pouvoir induire une infection gastro-intestinale colibacillaire chez le porc, il pourrait être intéressant d’évaluer l’efficacité thérapeutique et microbiologique, c’est à dire le taux de réduction de la population cible et l’apparition ou non de mutants résistants à la colistine.

Cette étude pourrait être complétée par la recherche de solutions permettant de réduire encore le risque d’émergence de mutants, par exemple par l’administration d’autres antimicrobiens bactéricides synergiques pour réduire la probabilité de sélection simultanée de mutants doublement résistants Naghmouchi et al. (2013).

Traitement antibiotique et résistance plasmidique

L’essai réalisé avec le ceftiofur nous a permis de montrer que la sélection de souches résistantes à cet antibiotique s’est limitée aux lots d’animaux qui possédaient déjà dans leur microbiote la souche *E. coli* M63, hébergeant le gène de résistance *bla*_{CTX-M-1} : les autres souches de *E. coli* ne peuvent acquérir une résistance de haut niveau aux C3G par simple mutation. Le gène *bla*_{CTX-M-1} a été transmis à d’autres souches de *E. coli*, probablement par conjugaison, ce qui devra être vérifié en analysant les autres résistances acquises, voire en séquençant les plasmides présents dans les souches de *E. coli* résistantes aux C3G autres que *E. coli* M63.

Outre les perspectives déjà envisagées concernant la caractérisation par séquençage du microbiote des animaux, et en particulier de celui du porc super-excréteur, ainsi que la modélisation de la diffusion de la résistance entre animaux en fonction de modalités thérapeutiques, nous pourrions aussi évaluer l’efficacité du traitement par ceftiofur sur des animaux malades, et analyser dans ces conditions l’impact de cet antibiotique sur la flore des porcs. Nous pouvons aussi envisager de poursuivre nos investigations, en utilisant le modèle de fermenteur *in vitro* : il sera ainsi possible de comparer en conditions standardisées, voire de modéliser, la stabilité et la diffusion entre souches d’Entérobactéries de différents plasmides ainsi que la durée et l’intensité de l’augmentation de populations résistantes aux C3G en fonction des molécules et schémas

thérapeutiques choisis.

Ces études pourraient être réalisées en faisant varier les gènes de résistance, les plasmides, les souches de *E. coli* ou d'autres Entérobactéries telles que *Salmonella* par exemple, donatrices ou receveuses, ainsi que les conditions expérimentales. En effet, comme pour les mutations chromosomiques, il est reconnu que les transferts de gènes sont favorisés par la réponse SOS chez les bactéries (Beaber et al., 2003; Johnsen and Kroer, 2007).

L'utilisation de fermenteurs pourra aussi être mise à profit pour explorer le phénomène de super-excrétion de souches résistantes, décrit par Horton et al. (2011), que nous avons pu observer lors de notre expérimentation.

Dans un autre domaine, différentes pistes ont été avancées pour tenter d'expliquer l'excrétion très forte par certains bovins de *E. coli* O157:H7 Munns et al. (2014) : il semble toutefois encore difficile de préciser clairement les facteurs prédisposants ou déterminants, qu'ils soient relatifs à la souche bactérienne, au microbiote ou à l'animal.

Pour l'étude de la résistance aux C3G, nous pourrions, dans un premier temps, rechercher des modifications du patrimoine génétique (mutations, transferts horizontaux de gènes) de la souche *E. coli* M63 qui auraient pu se produire au sein de l'écosystème colique du porc super-excréteur et favoriser sa compétitivité ; cette analyse pourrait être réalisée par séquençage total de la souche inoculée et d'isolats obtenus à partir de cet animal super-excréteur.

L'utilisation de fermenteurs ensemencés avec le microbiote d'un porc super-excréteur pourrait permettre ensuite d'évaluer si ce phénomène est reproduit dans les conditions *in vitro*. Dans ce cas, l'utilisation de différents souches, plasmides ou gènes de résistance permettrait de savoir si le caractère est lié à certains de ces éléments.

Par ailleurs, l'impact de modifications du microbiote ensemencé, induites par inoculation de probiotiques, par modification de paramètres physico-chimiques ou encore par ajout de divers additifs, pourrait être évalué et permettre d'envisager des solutions applicables sur le terrain.

Les méthodes utilisées

L'impact des traitements par la colistine ou le ceftiofur sur le microbiote a été analysé au cours de cette thèse essentiellement par une méthode de PCR quantitative pour estimer la taille des grands groupes bactériens (Furet et al., 2009). Ceci sous-entend une sélection préalable des cibles recherchées et donc une analyse seulement des principales populations présentes dans le microbiote intestinal.

Comme indiqué précédemment, il est maintenant beaucoup plus facile de recourir aux méthodes basées sur le séquençage total. Il serait intéressant, suite aux évolutions des techniques d'étude et de leurs coûts respectifs, qu'une analyse plus fine par pyroséquençage puisse être faite afin d'obtenir plus d'informations sur les différentes espèces susceptibles d'être impactées par ces deux traitements antibiotiques.

Les résultats des analyses effectuées par qPCR permettent d'effectuer un pré-screening des

échantillons les plus pertinents, soit parce qu'ils sont représentatifs de la population, soit au contraire parce-qu'ils sont déviants (exemple de l'animal super excréteur retrouvé lors de nos essais). Les méthodes de séquençage total autorisant une étude beaucoup plus profonde de la composition du microbiote digestif (Looft et al., 2012; Park et al., 2014), des modifications des distributions des genres ou espèces bactériens, passées inaperçues au cours de notre étude, seront peut-être mises en évidence et nous permettront de mieux évaluer les perturbations consécutives à l'utilisation des antibiotiques.

Certains des échantillons obtenus lors de l'essai effectué avec un traitement antibiotique à la colistine sont actuellement en cours de séquençage et les résultats obtenus devraient faire l'objet d'une publication scientifique.

Le modèle *in vitro*

Suite à l'application dans l'Union Européenne de la règle des 3 R (Réduire, Raffiner, Remplacer) constituant la base de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale, l'utilisation de modèles *in vitro* représente une alternative intéressante à l'expérimentation animale. Les intérêts sont multiples allant des avantages techniques au volet économique (coût des expériences plus faible et pas de délai d'attente, contrairement aux études *in vivo* où il faut patienter avant d'avoir des animaux à un stade précis, par exemple, en post-sevrage).

De ce fait, il est possible *in vitro* de multiplier les expérimentations et les conditions expérimentales et ce, sans problème éthique majeur et dans un temps plus court.

Au cours de cette thèse, un modèle *in vitro* colique a été adapté à la fermentation du porcelet. Ce dernier a ensuite été validé par rapport à des données *in vivo* dans deux cas d'étude, normobiose et dysbiose (traitement à la colistine). Enfin, il a été utilisé pour évaluer l'impact d'un probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur le microbiote intestinal du porcelet.

Cependant, il est primordial de connaître les limites de chaque modèle. En effet, les interactions microbiote/hôte ne peuvent pas être étudiées dans un modèle classique *in vitro*, telles que par exemple, les effets invasifs potentiels, au niveau de l'intestin, de bactéries pathogènes : il existe une réelle limite en terme de conclusions généralisables au niveau de l'animal. De ce fait, il s'avère nécessaire de compléter les études *in vitro* par des études *in vivo* ou de poursuivre l'évolution des modèles *in vitro* actuels, telle qu'elle est amorcée avec les systèmes innovants M-SHYME ou HMI.

L'objectif global d'un traitement antibiotique est d'obtenir les meilleurs résultats en tenant compte de l'ensemble des paramètres, bactériologiques, pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Il faut trouver le meilleur compromis entre concentration en antibiotique administrée pour l'effet bactéricide recherché pour la population pathogène cible, absence de sélection de bactéries résistantes au niveau de cette population cible comme au niveau des différents microbiotes de l'hôte et minimisation de l'effet toxique en particulier sur le microbiote digestif.

L'outil *in vitro* mis en place dans le cadre de cette thèse se positionne comme un outil per-

tiennent pour tester différents antibiotiques à différentes doses. De même, il sera particulièrement utile pour évaluer l'impact de nouvelles stratégies alternatives aux antibiotiques sur le microbiote du porcelet, l'oxyde de zinc (en tenant compte de l'éventuelle autorisation d'utilisation), certaines enzymes ou encore de nouveaux probiotiques déjà évoqués (*c.f.* 1.1.2.2, page 13).

Enfin, dans le cadre d'un stage post-doctoral, il est programmé d'adapter ce modèle *in vitro* à un état de dysbiose en période de post-sevrage. Dans le contexte de ce projet, des tests de stratégies alternatives aux antibiotiques, et en particulier d'administration de probiotiques, seront menés afin d'évaluer leur impact sur le microbiote colique porcin.

Références bibliographiques

Bibliographie

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., and Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine*, 6(237) :237ra65–237ra65.
- Agersø, Y. and Aarestrup, F. M. (2013). Voluntary ban on cephalosporin use in Danish pig production has effectively reduced extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in slaughter pigs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(3) :569–572.
- Agersø, Y., Aarestrup, F. M., Pedersen, K., Seyfarth, A. M., Struve, T., and Hasman, H. (2011). Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67 :582–588.
- Agga, G., Scott, H., Amachawadi, R., Nagaraja, T., Vinasco, J., Bai, J., Norby, B., Renter, D., Dritz, S., Nelssen, J., and Tokach, M. (2014). Effects of chlortetracycline and copper supplementation on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from weaned pigs. *Preventive veterinary medicine*, 114 :231–246.
- Akkermans, A., Konstantinov, S., Zhu, W., Favier, C., and Williams, B. (2003). volume Vol. 1.
- Allison, M. J., Robinson, I., Bucklin, J., and Booth, G. (1979). Comparison of bacterial populations of the pig cecum and colon based upon enumeration with specific energy sources. *Applied and environmental microbiology*, 37(6) :1142–1151.
- Anses (2010). FARM 2007-2008, Programme français de surveillance de l’antibiorésistance des bactéries d’origine animale. (www.anses.fr).
- Anses (2012). Utilisation de l’oxyde de zinc dans l’alimentation des porcelets au sevrage, rapport d’expertise collective. *Saisine 2012-SA-0067*, (www.anses.fr).
- Anses (2014). Risques d’émergence d’antibiorésistances liés aux modes d’utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale. *Auto-saisine num. 2011-SA-0071*, (www.anses.fr).
- Anses-ANMV (2014). Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2013. volumes et estimation de l’exposition des animaux aux antibiotiques. *Edit., A., ed. (Maisons-Alfort)*, (www.anses.fr).

- Awati, A., Williams, B., Bosch, M., Li, Y., and Verstegen, M. (2006). Use of the *in vitro* cumulative gas production technique for pigs : An examination of alterations in fermentation products and substrate losses at various time points. *Journal of animal science*, 84(5) :1110–1118.
- Baer, A. A., Miller, M. J., and Dilger, A. C. (2013). Pathogens of interest to the pork industry : a review of research on interventions to assure food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(2) :183–217.
- Baker, A., Davis, E., Spencer, J., Moser, R., and Rehberger, T. (2013). The effect of a *Bacillus* based direct-fed microbial supplemented to sows on the gastrointestinal microbiota of their neonatal piglets. *Journal of animal science*, 91 :3390–3399.
- Beaber, J. W., Hochhut, B., and Waldor, M. K. (2003). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427(6969) :72–74.
- Beerens, H. (1991). Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Applied and environmental microbiology*, 57(8) :2418–2419.
- Belloc, C., Lam, D., Pellerin, J.-L., Beaudreau, F., and Laval, A. (2005). Effect of quinolone treatment on selection and persistence of quinolone-resistant *Escherichia coli* in swine faecal flora. *Journal of applied microbiology*, 99(4) :954–959.
- Béraud, P. (2011). Biotechnologies de la reproduction porcine. *Inra Prod. Anim*, 22(2) :97–116.
- Bergen, P. J., Tsuji, B. T., Bulitta, J. B., Forrest, A., Jacob, J., Sidjabat, H. E., Paterson, D. L., Nation, R. L., and Li, J. (2011). Synergistic killing of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* at multiple inocula by colistin combined with doripenem in an *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(12) :5685–5695.
- Bindelle, J., Buldgen, A., Delacollette, M., Wavreille, J., Agneessens, R., Destain, J.-P., and Leterme, P. (2009). Influence of source and concentrations of dietary fiber on *in vivo* nitrogen excretion pathways in pigs as reflected by *in vitro* fermentation and nitrogen incorporation by fecal bacteria. *Journal of animal science*, 87(2) :583–593.
- Bindelle, J., Buldgen, A., Wavreille, J., Agneessens, R., Destain, J.-P., Wathelet, B., and Leterme, P. (2007). The source of fermentable carbohydrates influences the *in vitro* protein synthesis by colonic bacteria isolated from pigs. *Cambridge University Journal*, 1 :1126–1133.
- Bindelle, J., Pieper, R., Montoya, C. A., Van Kessel, A. G., and Leterme, P. (2011). Nons-tarch polysaccharide-degrading enzymes alter the microbial community and the fermentation patterns of barley cultivars and wheat products in an *in vitro* model of the porcine gastrointestinal tract. *FEMS microbiology ecology*, 76(3) :553–563.

- Bird, A. R., Vuaran, M., Crittenden, R., Hayakawa, T., Playne, M. J., Brown, I. L., and Topping, D. L. (2009). Comparative effects of a high-amylose starch and a fructooligosaccharide on fecal bifidobacteria numbers and short-chain fatty acids in pigs fed *Bifidobacterium animalis*. *Digestive diseases and sciences*, 54(5) :947–954.
- Biswas, S., Brunel, J.-M., Dubus, J.-C., Reynaud-Gaubert, M., and Rolain, J.-M. (2012). Colistin : an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 10 :917–934.
- Blachier, F., Wu, G., and Yin, Y. (2013). *Nutritional and physiological functions of amino acids in pigs*. Springer.
- Blázquez, J., Couce, A., Rodríguez-Beltrán, J., and Rodríguez-Rojas, A. (2012). Antimicrobials as promoters of genetic variation. *Current opinion in microbiology*, 15(5) :561–569.
- Boesen, H. T., Jensen, T. K., Schmidt, A. S., Jensen, B. B., Jensen, S. M., and Møller, K. (2004). The influence of diet on *Lawsonia intracellularis* colonization in pigs upon experimental challenge. *Veterinary microbiology*, 103(1) :35–45.
- Bomba, A., Nemcova, R., Gancarcikova, S., Herich, R., Guba, P., and Mudronova, D. (2002). Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *British Journal of Nutrition*, 88(S1) :S95–S99.
- Bosi, P. and Trevisi, P. (2010). New topics and limits related to the use of beneficial microbes in pig feeding. *Beneficial microbes*, 1(4) :447–454.
- Broadway, P., Carroll, J., and Callaway, T. (2014). Alternative antimicrobial supplements that positively impact animal health and food safety. *Agriculture, Food and Analytical Bacteriology*, 4(2) :109–121.
- Broom, L., Miller, H., Kerr, K., and Knapp, J. (2006). Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* sf68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. *Research in veterinary science*, 80(1) :45–54.
- Burel, C., Tanguy, M., Guerre, P., Boilletot, E., Cariolet, R., Queguiner, M., Postollec, G., Pinton, P., Salvat, G., Oswald, I. P., et al. (2013). Effect of low dose of fumonisins on pig health : Immune status, intestinal microbiota and sensitivity to *Salmonella*. *Toxins*, 5(4) :841–864.
- Castillo, M., Martín-Orúe, S. M., Nofrarías, M., Manzanilla, E. G., and Gasa, J. (2007). Changes in caecal microbiota and mucosal morphology of weaned pigs. *Veterinary microbiology*, 124(3) :239–247.
- Cavaco, L., Abatih, E., Aarestrup, F. M., and Guardabassi, L. (2008). Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(10) :3612–3616.

- Chaucheyras-Durand, F. and Durand, H. (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial microbes*, 1(1) :3–9.
- Chauvin, C. (2009). *Usage des antibiotiques et résistance bactérienne en élevage de volailles*. PhD thesis, Rennes 1.
- Chauvin, C., Beloeil, P.-A., Orand, J.-P., Sanders, P., and Madec, F. (2002). A survey of group-level antibiotic prescriptions in pig production in France. *Preventive veterinary medicine*, 55(2) :109–120.
- Chauvin, C., Madec, F., Guillemot, D., and Sanders, P. (2001). The crucial question of standardisation when measuring drug consumption. *Veterinary research*, 32(6) :533–543.
- Chauvin, C., Querrec, M., Perot, A., Guillemot, D., and Sanders, P. (2008). Impact of antimicrobial drug usage measures on the identification of heavy users, patterns of usage of the different antimicrobial classes and time-trends evolution. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 31(4) :301–311.
- Cho, J. H., Zhao, P. Y., and Kim, I. H. (2011). Probiotics as a dietary additive for pigs : a review. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(16) :2127–2134.
- Cinquin, C., Le Blay, G., Fliss, I., and Lacroix, C. (2004). Immobilization of infant fecal microbiota and utilization in an *in vitro* colonic fermentation model. *Microbial ecology*, 48(1) :128–138.
- Clearsynth (2014). <http://www.clearsynth.com/structures1/cs-o-01180.gif>.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10) :4555–4558.
- Coffman, J. et al. (1999). *The use of drugs in food animals : benefits and risks*. CAB International.
- Collado, M. C., Isolauri, E., Salminen, S., and Sanz, Y. (2009). The impact of probiotic on gut health. *Current drug metabolism*, 10(1) :68–78.
- Combrisson, H. (2014). La directive 2010/63/UE : L’explicite et l’implicite. *Bulletin de l’Académie vétérinaire de France*, 167(2) :137–142.
- Communauté Européenne (2008). RÈGLEMENT (CE) No 889/2008 DE LA COMMISSION du 5 septembre 2008 portant modalités d’application du règlement (CE) No 834/2007 du Conseil relatif à la production biologique et à l’étiquetage des produits biologiques en ce qui concerne la production biologique, l’étiquetage et les contrôles.
- Conway, P. L. (1997). Development of intestinal microbiota. *Gastrointestinal microbiology*, 2 :3–38.

- Corr  g  , I., Berthelot, N., Aubry, A., BADOUARD, B., and HÉMONIC, A. (2011). Biosécurité, maîtrise sanitaire, conception et conduite d  levage : impact sur les performances technico-économiques. *Journées Rech. Porcine*, 43 :265–271.
- Davis, S., Illum, L., and Hinchcliffe, M. (2001). Gastrointestinal transit of dosage forms in the pig. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 53(1) :33–39.
- De Briyne, N., Atkinson, J., Borriello, S., and Pokludov  , L. (2014). Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Veterinary Record*, (doi : 10.1136/vr.102462).
- De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludov  , L., Borriello, S., and Price, S. (2013). Factors influencing antibiotic prescribing habits and use of sensitivity testing amongst veterinarians in Europe. *The Veterinary record*, 173(19) :475.
- De Grau, A., Dewey, C., Friendship, R., and de Lange, K. (2005). Observational study of factors associated with nursery pig performance. *Canadian journal of veterinary research*, 69(4) :241.
- D  at, E., Blanquet-Diot, S., Jarrige, J.-F., Denis, S., Beyssac, E., and Alric, M. (2009). Combining the dynamic tno-gastrointestinal tract system with a Caco-2 cell culture model : Application to the assessment of lycopene and alpha-tocopherol bioavailability from a whole food. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(23) :11314–11320.
- Delsol, A. A., Sunderland, J., Woodward, M. J., Pumbwe, L., Piddock, L. J., and Roe, J. M. (2004a). Emergence of fluoroquinolone resistance in the native *Campylobacter coli* population of pigs exposed to enrofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(5) :872–874.
- Delsol, A. A., Woodward, M. J., and Roe, J. M. (2004b). Effect of a 5 day enrofloxacin treatment on *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 in the pig. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2) :396–398.
- Den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., and Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*, 54(9) :2325–2340.
- DiGiulio, D. B., Romero, R., Amogan, H. P., Kusanovic, J. P., Bik, E. M., Gotsch, F., Kim, C. J., Erez, O., Edwin, S., and Relman, D. A. (2008). Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor : a molecular and culture-based investigation. *PloS one*, 3(8) :e3056.
- Doré, J., Morvan, B., Rieu-Lesme, F., Goderel, I., Gouet, P., and Pochart, P. (1995). Most probable number enumeration of H₂-utilizing acetogenic bacteria from the digestive tract of animals and man. *FEMS microbiology Letters*, 130(1) :7–12.

- Ducluzeau, R. and Raibaud, P. (1975). La flore microbienne du tube digestif chez le monogastrique et son influence sur les métabolismes nutritionnels de l'hôte. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 14(2) :133–144.
- Ducluzeau, R. and Raibaud, P. (1994). Écologie microbienne du tube digestif et modes d'action des probiotiques en nutrition animale. *Cahiers Agricultures*, 3(6) :353–360.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., and Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728) :1635–1638.
- EFSA (2011). Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum beta-lactamases and/or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal*, 9(2322).
- EFSA (2014). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. *EFSA Journal*, 12(3590).
- EMA (2014). European surveillance of veterinary antimicrobial consumption, "Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012", (EMA/333921/2014), Fourth ESVAC report. *European Medicines Agency*.
- Endimiani, A., Hilty, M., and Perreten, V. (2012). CMY-2-producing *Escherichia coli* in the nose of pigs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(8) :4556–4557.
- Estellé, J., Mach, N., Ramayo-Caldas, Y., Levenez, F., Lemonnier, G., Denis, C., Doré, J., Larzul, C., and Lepage, P. (2014). The influence of host's genetics on the gut microbiota composition in pigs and its links with immunity traits. In *10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Asas.
- Eurostat (2013). Eurostat statistique Européenne. (<http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/>)
- FAO/WHO, J. (2001). WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Córdoba, Argentina. October*, pages 1–4.
- Fava, F., Mäkituokko, H., Siljander-Rasi, H., Putaala, H., Tiihonen, K., Stowell, J., Tuohy, K., Gibson, G., and Rautonen, N. (2007). Effect of polydextrose on intestinal microbes and immune functions in pigs. *British journal of nutrition*, 98(01) :123–133.
- Feria-Gervasio, D., Denis, S., Alric, M., and Brugère, J.-F. (2011). *In vitro* maintenance of a human proximal colon microbiota using the continuous fermentation system p-ecsim. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(5) :1425–1433.

- Feria-Gervasio, D., Tottey, W., Gaci, N., Alric, M., Cardot, J.-M., Peyret, P., Martin, J.-F., Pujos, E., Sébédio, J.-L., and Brugère, J.-F. (2014). Three-stage continuous culture system with a self-generated anaerobiosis to study the regionalized metabolism of the human gut microbiota. *Journal of microbiological methods*, 96 :111–118.
- Ferran, A. A., Bibbal, D., Pellet, T., Laurentie, M., Gicquel-Bruneau, M., Sanders, P., Schneider, M., Toutain, P.-L., and Bousquet-Melou, A. (2013). Pharmacokinetic/pharmacodynamic assessment of the effects of parenteral administration of a fluoroquinolone on the intestinal microbiota : Comparison of bactericidal activity at the gut versus the systemic level in a pig model. *International journal of antimicrobial agents*, 42(5) :429–435.
- Fonty, G. and Chaucheyras-Durand, F. (2007). *Les écosystèmes digestifs*. Lavoisier.
- Foster, J. A., Bunge, J., Gilbert, J. A., and Moore, J. H. (2012). Measuring the microbiome : perspectives on advances in DNA-based techniques for exploring microbial life. *Briefings in bioinformatics*, bbr080v1 :1–10.
- Fraser, D., Pajor, E., and Feddes, J. (1994). The relationship between creep feeding behavior of piglets and adaptation to weaning : Effect of diet quality. *Canadian Journal of Animal Science*, 74(1) :1–6.
- Freter, R. (1983). Mechanisms that control the microflora in the large intestine. *Human intestinal microflora in health and disease*, pages 33–54.
- Furet, J.-P., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., Doré, J., and Corthier, G. (2009). Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS microbiology ecology*, 68(3) :351–362.
- Gadoud, R. (2004). *Nutrition et alimentation des animaux d'élevage, Volume 2*. Educagri.
- Gaskins, H. (2001). Intestinal bacteria and their influence on swine growth. *Swine Nutrition*, 2 :609–630.
- Gibson, G. and Wang, X. (1994). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(4) :412–420.
- Gibson, G. R., Cummings, J. H., and Macfarlane, G. T. (1988). Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 54(11) :2750–2755.
- Gould, I. (2009). Antibiotic resistance : the perfect storm. *International journal of antimicrobial agents*, 34 :S2–S5.
- Gérard, C. (2014). Cooper lance le porc sans antibiotique - Réussir Porc. (Mai 2014).

- Grave, K., Torren-Edo, J., and Mackay, D. (2010). Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65 :2037–2040.
- Guillouzouic, A., Caroff, N., Dauvergne, S., Lepelletier, D., Guyomard, A. P., Kempf, I., Reynaud, A., and Corvec, S. (2009). MLST typing of *Escherichia coli* isolates overproducing AmpC beta-lactamase. *Journal of Antimicrobial chemotherapy*, 63 :1290–1292.
- Haenen, D., da Silva, C. S., Zhang, J., Koopmans, S. J., Bosch, G., Vervoort, J., Gerrits, W. J., Kemp, B., Smidt, H., Müller, M., et al. (2013a). Resistant starch induces catabolic but suppresses immune and cell division pathways and changes the microbiome in the proximal colon of male pigs. *The Journal of nutrition*, 143(12) :1889–1898.
- Haenen, D., Zhang, J., da Silva, C. S., Bosch, G., van der Meer, I. M., van Arkel, J., van den Borne, J. J., Gutiérrez, O. P., Smidt, H., Kemp, B., et al. (2013b). A diet high in resistant starch modulates microbiota composition, SCFA concentrations, and gene expression in pig intestine. *The Journal of nutrition*, 143(3) :274–283.
- Hammerum, A., Larsen, J., Andersen, V., Lester, C., Skovgaard Skytte, T., Hansen, F., Olsen, S., Mordhorst, H., Skov, R., Aarestrup, F., and Agerso, Y. (2014). Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 69 :2650–2657.
- Hampson, D., Hinton, M., and Kidder, D. (1985). Coliform numbers in the stomach and small intestine of healthy pigs following weaning at three weeks of age. *Journal of comparative pathology*, 95(3) :353–362.
- Hampson, D. and Kidder, D. (1986). Influence of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the piglet small intestine. *Research in veterinary science*, 40(1) :24–31.
- Hänninen, M.-L. and Hannula, M. (2007). Spontaneous mutation frequency and emergence of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(6) :1251–1257.
- Hansen, K. H., Damborg, P., Andreassen, M., Nielsen, S. S., and Guardabassi, L. (2013). Carriage and fecal counts of cefotaxime M-producing *Escherichia coli* in pigs : a longitudinal study. *Applied and environmental microbiology*, 79(3) :794–798.
- Hartemink, R., Domenech, V., and Rombouts, F. (1997). Lamvab : A new selective medium for the isolation of *Lactobacilli* from faeces. *Journal of microbiological methods*, 29(2) :77–84.
- Havenaar, R. and Minekus, M. (1998). Système de réacteur. EP Patent 0,642,382.

- Hebert, H., Lurette, A., Fourichon, C., Seegers, H., and Belloc, C. (2007). Modalités de conduite en bandes en élevage porcin : effet sur les contacts entre animaux. *Journées Recherche Porcine*, 39 :345–350.
- Hedemann, M. S. and Jensen, B. B. (2004). Variations in enzyme activity in stomach and pancreatic tissue and digesta in piglets around weaning. *Archives of Animal Nutrition*, 58(1) :47–59.
- Heinritz, S. N., Mosenthin, R., and Weiss, E. (2013). Use of pigs as a potential model for research into dietary modulation of the human gut microbiota. *Nutrition research reviews*, 26(02) :191–209.
- Hémonic, A., Chauvin, C., and Corrége, I. (2014). Les utilisations d’antibiotiques en élevage de porcs : motifs et stratégies thérapeutiques associées. *Journées de la Recherche Porcine, Paris 4 et 5 février 2014*.
- Hémonic, A., Chauvin, C., Corrége, I., Guinaudeau, J., Soyer, J., Berthelot, N., Delzescaux, D., and Verliat, F. (2013). Mise au point d’un outil de suivi des usages d’antibiotiques dans la filière porcine. *45e Journées de la Recherche Porcine, Paris 5 et 6 février 2013*.
- Hering, J., Hille, K., Frömke, C., von Münchhausen, C., Hartmann, M., Schneider, B., Friese, A., Roesler, U., Merle, R., and Kreienbrock, L. (2014). Prevalence and potential risk factors for the occurrence of cefotaxime resistant *Escherichia coli* in German fattening pig farms - A cross-sectional study. *Preventive veterinary medicine*, 116(1) :129–137.
- Hijova, E. and Chmelarova, A. (2007). Short chain fatty acids and colonic health. *Bratislavské lekárske listy*, 108(8) :354.
- Hooper, L. V., Midtvedt, T., and Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual review of nutrition*, 22(1) :283–307.
- Hopwood, D. and Hampson, D. (2003). Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period. *Weaning the Pig : Concepts and Consequences. Wageningen, The Netherlands : Wageningen Academic Publishers*, pages 199–212.
- Horton, R., Randall, L., Snary, E., Cockrem, H., Lotz, S., Wearing, H., Duncan, D., Rabie, A., McLaren, I., Watson, E., et al. (2011). Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs : implications for environmental contamination and food production. *Applied and environmental microbiology*, 77(11) :3715–3719.
- Hudman, D. B., Friend, D. W., Hartman, P. A., Ashton, G., and Catron, D. (1957). Digestive enzymes of the baby pig. pancreatic and salivary amylase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5(9) :691–693.

- Huguet, A., Savary, G., Bobillier, E., Lebreton, Y., and Le Huërou-Luron, I. (2006). Effects of level of feed intake on pancreatic exocrine secretions during the early postweaning period in piglets. *Journal of animal science*, 84(11) :2965–2972.
- Huijsdens, X. W., Linskens, R. K., Mak, M., Meuwissen, S. G., Vandenbroucke-Grauls, C. M., and Savelkoul, P. H. (2002). Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*, 40(12) :4423–4427.
- Hutschemaekers, L., Jaartsveld, F., Oosterlee, C., Tielen, M., and Verstegen, M. (1976). [hygiene in the rearing of piglets. a study of the effect of hygiene and the bacterial content of drinking-water and feed of baby pigs on a number of health and performance characteristics on pig-breeding farms (author’s transl)]. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 101(7) :355–364.
- Ice, A., Grant, A., Clark, L., Cline, T., Einstein, M., Martin, T., and Diekman, M. (1999). Health and growth performance of barrows reared in all-in/all-out or continuous flow facilities with or without a chlortetracycline feed additive. *American journal of veterinary research*, 60(5) :603–608.
- IFIP (2013). *Mémento de l’éleveur de Porc*. IFIP - Institut du Porc.
- IFIP (2014). *Le Porc par les chiffres*. IFIP - Institut du Porc (2013 - 2014).
- Ilari, E., Daridan, D., Desbois, D., Fraysse, J., and Fraysse, J. (2004). Les systèmes de production du porc en France : typologie des exploitations agricoles ayant des porcs. *Journées de la Recherche Porcine*, 36 :1.
- Inman, C., Haverson, K., Konstantinov, S., Jones, P., Harris, C., Smidt, H., Miller, B., Bailey, M., and Stokes, C. (2010). Rearing environment affects development of the immune system in neonates. *Clinical & Experimental Immunology*, 160(3) :431–439.
- Institut National Recherche Agronomique, I. (1989). *L’alimentation des animaux monogastriques : porc, lapin, volailles*. Editions Quae.
- Jansman, A., Zhang, J., Koopmans, S., Dekker, R., and Smidt, H. (2012). Effects of a simple or a complex starter microbiota on intestinal microbiota composition in caesarean derived piglets. *Journal of animal science*, 90(Supplement 4) :433–435.
- Jarrige, N., Jouy, E., Haenni, M., Gay, E., and Madec, J.-Y. (2014). *Rapport annuel Resapath 2013 : Réseau d’épidémiosurveillance de l’antibiorésistance des bactéries pathogènes animales*. Agence nationale de sécurité sanitaire de l’alimentation, de l’environnement et du travail.
- Jensen, V. F., Emborg, H.-D., and Aarestrup, F. M. (2012). Indications and patterns of therapeutic use of antimicrobial agents in the Danish pig production from 2002 to 2008. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 35(1) :33–46.

- Jensen, V. F., Enøe, C., Wachmann, H., and Nielsen, E. O. (2010). Antimicrobial use in Danish pig herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Preventive veterinary medicine*, 95(3) :239–247.
- Johnsen, A. R. and Kroer, N. (2007). Effects of stress and other environmental factors on horizontal plasmid transfer assessed by direct quantification of discrete transfer events. *FEMS microbiology ecology*, 59(3) :718–728.
- Jørgensen, C. J., Cavaco, L. M., Hasman, H., Emborg, H.-D., and Guardabassi, L. (2007). Occurrence of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* in pigs treated with ceftiofur. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(5) :1040–1042.
- Juin, H., Nozières, M., and Peyraud, J. (2014). Révision de la directive européenne sur l’expérimentation animale : qu’en est-il pour la recherche agronomique ? *Productions animales*, 27(1) :65–71.
- Kempf, I., Fleury, M. A., Drider, D., Bruneau, M., Sanders, P., Chauvin, C., Madec, J.-Y., and Jouy, E. (2013). What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe ? *International journal of antimicrobial agents*, 42(5) :379–383.
- Kempf, I., Jouy, E., Granier, S., and Bruneau, M. (2014). L’antibiorésistance des bactéries isolées chez le porc (première partie). *Le nouveau praticien vétérinaire, élevages et santé*, 6 :189–194.
- Kenny, M., Smidt, H., Mengheri, E., and Miller, B. (2011). Probiotics—do they have a role in the pig industry ? *animal*, 5(03) :462–470.
- Kieffer, N., Poirel, L., Nordmann, P., Madec, J.-Y., and Haenni, M. (2014). Emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from veterinary medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, page dku485.
- Kim, B.-S., Kim, J. N., and Cerniglia, C. E. (2011). *In vitro* culture conditions for maintaining a complex population of human gastrointestinal tract microbiota. *BioMed Research International*, 2011 :838–840.
- Konstantinov, S. R., Awati, A. A., Williams, B. A., Miller, B. G., Jones, P., Stokes, C. R., Akkermans, A. D., Smidt, H., and De Vos, W. M. (2006). Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environmental microbiology*, 8(7) :1191–1199.
- Konstantinov, S. R., Favier, C. F., Zhu, W. Y., Williams, B. A., Klüß, J., Souffrant, W.-B., de Vos, W. M., Akkermans, A. D., Smidt, H., et al. (2004). Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Animal Research*, 53(4) :317–324.

- Konstantinov, S. R., Smidt, H., Akkermans, A. D., Casini, L., Trevisi, P., Mazzoni, M., De Filippi, S., Bosi, P., and De Vos, W. M. (2008). Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* f4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. *FEMS microbiology ecology*, 66(3) :599–607.
- Kram, K. E. and Finkel, S. E. (2014). Culture volume and vessel affect long-term survival, mutation frequency, and oxidative stress of *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 80(5) :1732–1738.
- Krause, D., Easter, R., and Mackie, R. (1994). Fermentation of stachyose and raffinose by hind-gut bacteria of the weanling pig. *Letters in applied microbiology*, 18(6) :349–352.
- Kus, J. V., Gebremedhin, A., Dang, V., Tran, S.-L., Serbanescu, A., and Foster, D. B. (2011). Bile salts induce resistance to polymyxin in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. *Journal of bacteriology*, 193(17) :4509–4515.
- Lalles, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., and Stokes, C. R. (2007). Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66(02) :260–268.
- Lallès, J.-P., Konstantinov, S., and Rothkötter, H.-J. (2004). Bases physiologiques, microbiologiques et immunitaires des troubles digestifs du sevrage chez le porcelet : données récentes dans le contexte de la suppression des antibiotiques additifs alimentaires. *J. Rech. Porcine*, 36 :139–150.
- Lamendella, R., Santo Domingo, J. W., Ghosh, S., Martinson, J., and Oerther, D. B. (2011). Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC microbiology*, 11(1) :103.
- Le Carrou, J., Laurentie, M., Kobisch, M., and Gautier-Bouchardon, A. (2006). Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the parC gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(6) :1959–1966.
- Legendre, V., Alibert, L., Roinsard, A., and Cresson, C. (2013). Analyse de la production porcine biologique en France : quels freins et leviers à son développement? (www.ifip.asso.fr/sites/default/files/pdf.../legendre2013.pdf).
- Leser, T. D., Amenuvor, J. Z., Jensen, T. K., Lindecrona, R. H., Boye, M., and Møller, K. (2002). Culture-independent analysis of gut bacteria : the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2) :673–690.
- Leser, T. D., Lindecrona, R. H., Jensen, T. K., Jensen, B. B., and Møller, K. (2000). Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Applied and environmental microbiology*, 66(8) :3290–3296.

- Leser, T. D. and Mølbaek, L. (2009). Better living through microbial action : the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental microbiology*, 11(9) :2194–2206.
- Lessard, M., Dupuis, M., Gagnon, N., Nadeau, E., Matte, J., Goulet, J., and Fairbrother, J. (2009). Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *Journal of animal science*, 87(3) :922–934.
- Li, X.-Z., Mehrotra, M., Ghimire, S., and Adewoye, L. (2007). Beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary microbiology*, 121(3) :197–214.
- Liu, H., Zhang, J., Zhang, S., Yang, F., Thacker, P. A., Zhang, G., Qiao, S., and Ma, X. (2014). Oral administration of *Lactobacillus fermentum* i5007 favors intestinal development and alters the intestinal microbiota in formula-fed piglets. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(4) :860–866.
- Lodemann, U., Lorenz, B. M., Weyrauch, K. D., and Martens, H. (2008). Effects of *Bacillus cereus* var. *toyoii* as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets. *Archives of animal nutrition*, 62(2) :87–106.
- Loh, G., Eberhard, M., Brunner, R. M., Hennig, U., Kuhla, S., Kleessen, B., and Metges, C. C. (2006). Inulin alters the intestinal microbiota and short-chain fatty acid concentrations in growing pigs regardless of their basal diet. *The Journal of nutrition*, 136(5) :1198–1202.
- Looft, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfeld, R. D., Sul, W. J., Stedtfeld, T. M., Chai, B., Cole, J. R., et al. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5) :1691–1696.
- Lutz, E. A., McCarty, M. J., Mollenkopf, D. F., Funk, J. A., Gebreyes, W. A., and Wittum, T. E. (2011). Ceftiofur use in finishing swine barns and the recovery of fecal *Escherichia coli* or *Salmonella* spp. resistant to ceftriaxone. *Foodborne pathogens and disease*, 8(11) :1229–1234.
- Macfarlane, G., Macfarlane, S., and Gibson, G. (1998). Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microbial Ecology*, 35(2) :180–187.
- Macfarlane, G. T. and Macfarlane, S. (2007). Models for intestinal fermentation : association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Current opinion in biotechnology*, 18(2) :156–162.
- Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., and De Simone, C. (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*, 121(3) :580–591.

- Mahan, D., Cromwell, G., Ewan, R., Hamilton, C., and Yen, J. (1998). Evaluation of the feeding duration of a phase 1 nursery diet to three-week-old pigs of two weaning weights. ncr-42 committee on swine nutrition. *Journal of animal science*, 76(2) :578–583.
- Mao, E. F., Lane, L., Lee, J., and Miller, J. H. (1997). Proliferation of mutators in a cell population. *Journal of Bacteriology*, 179(2) :417–422.
- Maran (2011). Veterinary antibiotic usage in the Netherlands in 2010 - (<http://www.wageningenur.nl/en/research-results/projects-and-programmes/maran-antibiotic-usage.htm>).
- Marchesi, J. and Shanahan, F. (2007). The normal intestinal microbiota. *Current opinion in infectious diseases*, 20(5) :508–513.
- Martín, R., Delgado, S., Maldonado, A., Jiménez, E., Olivares, M., Fernández, L., Sobrino, O. J., and Rodríguez, J. M. (2009). Isolation of *Lactobacilli* from sow milk and evaluation of their probiotic potential. *Journal of dairy research*, 76(04) :418–425.
- Martinez, R. C., Cardarelli, H. R., Borst, W., Albrecht, S., Schols, H., Gutiérrez, O. P., Maathuis, A. J., Melo Franco, B. D., Martinis, E. C., Zoetendal, E. G., et al. (2013). Effect of galactooligosaccharides and *Bifidobacterium animalis* bb-12 on growth of *Lactobacillus amylovorus* dsm 16698, microbial community structure, and metabolite production in an in vitro colonic model set up with human or pig microbiota. *FEMS microbiology ecology*, 84(1) :110–123.
- Marzorati, M., Vanhoecke, B., De Ryck, T., Sadabad, M. S., Pinheiro, I., Possemiers, S., Van den Abbeele, P., Derycke, L., Bracke, M., Pieters, J., et al. (2014). The hmi module : a new tool to study the host-microbiota interaction in the human gastrointestinal tract *in vitro*. *BMC microbiology*, 14(1) :133.
- Massabie, P., Granier, R., Le Dividich, J., Chevillon, P., Bouyssière, M., Lebret, B., and Le Denmat, M. (1998). Influence des conditions d'élevage sur les performances de croissance du porc et la qualité des viandes. *Effets sur les performances zootechniques et la qualité de carcasse. In Journées de la Recherche Porcine*, 30 :37–41.
- McCracken, B. A., Spurlock, M. E., Roos, M. A., Zuckermann, F. A., and Gaskins, H. R. (1999). Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *The Journal of nutrition*, 129(3) :613–619.
- Meunier, D., Jouy, E., Lazizzera, C., Kobisch, M., and Madec, J.-Y. (2006). CTX-M-1-and CTX-M-15-type beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in france. *International journal of antimicrobial agents*, 28(5) :402–407.
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R., et al. (1995). Multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*, 23 :197–209.

- Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (2012). Plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire (<http://agriculture.gouv.fr/le-plan-antibioresistance,1942>).
- Mollenkopf, D. F., Mirecki, J. M., Daniels, J. B., Funk, J. A., Henry, S. C., Hansen, G. E., Davies, P. R., Donovan, T. S., and Wittum, T. E. (2013). *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M cephalosporinase from swine finishing barns and their association with antimicrobial use. *Applied and environmental microbiology*, 79(3) :1052–1054.
- Moodley, A. and Guardabassi, L. (2009). Transmission of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(4) :1709–1711.
- Moore, W., Moore, L., Cato, E., Wilkins, T., and Kornegay, E. (1987). Effect of high-fiber and high-oil diets on the fecal flora of swine. *Applied and environmental microbiology*, 53(7) :1638–1644.
- Moreno, M. (2012). Survey of quantitative antimicrobial consumption in two different pig finishing systems. *The Veterinary Record*, 171(13) :325–325.
- Mori, K., Ito, T., Miyamoto, H., Ozawa, M., Wada, S., Kumagai, Y., Matsumoto, J., Naito, R., Nakamura, S., Kodama, H., et al. (2011). Oral administration of multispecies microbial supplements to sows influences the composition of gut microbiota and fecal organic acids in their post-weaned piglets. *Journal of bioscience and bioengineering*, 112(2) :145–150.
- Mulder, I. E., Schmidt, B., Stokes, C. R., Lewis, M., Bailey, M., Aminov, R. I., Prosser, J. I., Gill, B. P., Pluske, J. R., Mayer, C.-D., et al. (2009). Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biology*, 7(1) :79.
- Munns, K. D., Selinger, L. B., Stanford, K., Guan, L., Callaway, T. R., and McAllister, T. A. (2014). Perspectives on super-shedding of *Escherichia coli* O157 :H7 by Cattle. *Foodborne pathogens and disease*, page (in press).
- Naghmouchi, K., Baah, J., Hober, D., Jouy, E., Rubrecht, C., Sané, F., and Drider, D. (2013). Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling Gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(6) :2719–2725.
- Nanthakumar, N. N., Dai, D., Newburg, D. S., and Walker, W. A. (2003). The role of indigenous microflora in the development of murine intestinal fucosyl- and sialyltransferases. *The FASEB Journal*, 17(1) :44–46.
- Office International des Epizooties (2012). Code sanitaire pour les animaux terrestres de l'oie - chapitre 6.8 : Contrôle des quantités d'agents antimicrobiens chez les animaux dont la

chair ou les produits sont destinés à la consommation humaine et détermination des profils d'utilisation.

O'Hara, A. M., O'Regan, P., Fanning, Á., O'Mahony, C., MacSharry, J., Lyons, A., Bienenstock, J., O'Mahony, L., and Shanahan, F. (2006). Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology*, 118(2) :202–215.

Ouwehand, A. C., Salminen, S., and Isolauri, E. (2002). Probiotics : an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1-4) :279–289.

Ozawa, M. and Asai, T. (2012). Relationships between mutant prevention concentrations and mutation frequencies against enrofloxacin for avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science*, 75(6) :709–713.

Park, S., Kim, J., J.S., L., Rhee, S., and Kim, H. (2014). Characterization of the fecal microbiome in different swine groups by high-throughput sequencing. *Anaerobe*, 28 :157–162.

Parliament, E.-U. and the Council of the European Union (2010). Directive 2010/63/(eu) of the european parliament and of the council of 22 september 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official J Eur Union*, 276.

Payne, A. N., Zihler, A., Chassard, C., and Lacroix, C. (2012). Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends in biotechnology*, 30(1) :17–25.

Pedersen, R., Andersen, A. D., Hermann-Bank, M. L., Stagsted, J., and Boye, M. (2013). The effect of high-fat diet on the composition of the gut microbiota in cloned and non-cloned pigs of lean and obese phenotype. *Gut microbes*, 4(5) :371–381.

Pellois, H., Boulot, S., and Caugant, A. (1998). La conduite en bandes "3 semaines" majoritaire. *Atout Porc. Mai*, pages 16–17.

Pérez Gutiérrez, O. (2010). *Unraveling piglet gut microbiota dynamics in response to feed additives*. Wageningen UR Digital Library.

Perrin, A., Bruneau, M., Houee, P., Poirier, C., Kempf, I., Granier, S., Madec, J., Laurentie, M., and Sanders, P. (2011). 11 years of monitoring on third-generation-cephalosporins resistance in commensal *Escherichia coli* from food animals in France. *Proceedings Antimicrobial resistance in animals and environment (Tours, France)*.

Petit, S., Richard, N., and Médard, F. H. (2014). *Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires 2014 et des produits de Santé Animale commercialisés en France (19e édition)*.

Pieper, R., Bindelle, J., Rossnagel, B., Van Kessel, A., and Leterme, P. (2009a). Effect of carbohydrate composition in barley and oat cultivars on microbial ecophysiology and proliferation

- of *Salmonella enterica* in an *in vitro* model of the porcine gastrointestinal tract. *Applied and environmental microbiology*, 75(22) :7006–7016.
- Pieper, R., Janczyk, P., Urubschurov, V., Korn, U., Pieper, B., and Souffrant, W. (2009b). Effect of a single oral administration of *Lactobacillus plantarum* dsmz 8862/8866 before and at the time point of weaning on intestinal microbial communities in piglets. *International journal of food microbiology*, 130(3) :227–232.
- Pinault, L., Pouliquen, H., and Vandaële, E. (2008). Vade-mecum de législation en pharmacie vétérinaire. *Les éditions du Point Vétérinaire*.
- Pinloche, E., Williams, M., D’Inca, R., Auclair, E., and Newbold, C. (2012). Use of a colon simulation technique to assess the effect of live yeast on fermentation parameters and microbiota of the colon of pig. *Journal of animal science*, 90(Supplement 4) :353–355.
- Pluske, J. (2001). Morphological and functional changes in the small intestine of the newly-weaned pig. *Gut environment of pigs*, pages 1–27.
- Pluske, J. R. (2013). Feed-and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs. *J Anim Sci Biotechnol*, 4(1) :1.
- Poirel, L., Bonnin, R. A., and Nordmann, P. (2012). Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative rods. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(5) :883–893.
- Poncet, L. (2013). *Le médicament vétérinaire et la lutte contre l’antibiorésistance : contribution à l’étude scientifique du débat et de ses enjeux à partir d’une double analyse, bibliographique et expérimentale (étude qualitative de la littérature professionnelle des vétérinaires et des pharmaciens)*. PhD thesis, Lyon.
- Postma, M., Sjölund, M., Collineau, L., Lösken, S., Stärk, K. D., Dewulf, J., Andreasen, M., Backhans, A., Belloc, C., Emanuelson, U., et al. (2015). Assigning defined daily doses animal : a European multi-country experience for antimicrobial products authorized for usage in pigs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(1) :294–302.
- Price, K., Totty, H., Lee, H., Utt, M., Fitzner, G., Yoon, I., Ponder, M., and Escobar, J. (2010). Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during *Salmonella* infection. *Journal of animal science*, 88(12) :3896–3908.
- Pryde, S. E., Richardson, A. J., Stewart, C. S., and Flint, H. J. (1999). Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig. *Applied and environmental microbiology*, 65(12) :5372–5377.
- Riboulet-Bisson, E., Sturme, M. H., Jeffery, I. B., O’Donnell, M. M., Neville, B. A., Forde, B. M., Claesson, M. J., Harris, H., Gardiner, G. E., Casey, P. G., et al. (2012). Effect of

- Lactobacillus salivarius* bacteriocin abp118 on the mouse and pig intestinal microbiota. *PloS one*, 7(2) :e31113.
- Robert-Dernuet (1995). *Antibiotiques et Antibiogrammes*.
- Robinson, I. M., Allison, M. J., and Bucklin, J. A. (1981). Characterization of the cecal bacteria of normal pigs. *Applied and environmental microbiology*, 41(4) :950–55.
- Robinson, I. M., Whipp, S. C., Bucklin, J. A., and Allison, M. J. (1984). Characterization of pre-dominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. *Applied and environmental microbiology*, 48(5) :964–969.
- Rodrigues, C., Machado, E., Peixe, L., and Novais, Â. (2013). IncI1/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of blaTEM-52 and blaCTX-M-1/-32 in diverse *Escherichia coli* clones from different piggeries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(10) :2245–2248.
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., and Blázquez, J. (2013). Antibiotics and antibiotic resistance : a bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6) :293–297.
- Rose, N., Larour, G., Le Diguerher, G., Eveno, E., Jolly, J., Blanchard, P., Oger, A., Le Dimna, M., Jestin, A., and Madec, F. (2003). Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (pmws) in 149 french farrow-to-finish herds. *Preventive veterinary medicine*, 61(3) :209–225.
- Roselli, M., Finamore, A., Britti, M. S., Konstantinov, S. R., Smidt, H., de Vos, W. M., and Mengheri, E. (2007). The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage. *The Journal of nutrition*, 137(12) :2709–2716.
- Rounds, W. and Herd, D. B. (2012). The cow’s digestive system.
- Russell, E. G. (1979). Types and distribution of anaerobic bacteria in the large intestine of pigs. *Applied and environmental microbiology*, 37(2) :187–193.
- Russell, W. R., Hoyles, L., Flint, H. J., and Dumas, M.-E. (2013). Colonic bacterial metabolites and human health. *Current opinion in microbiology*, 16(3) :246–254.
- Saint-Cyr, M. J., Perrin-Guyomard, A., Houée, P., Rolland, J.-G., and Laurentie, M. (2013). Evaluation of an oral subchronic exposure of deoxynivalenol on the composition of human gut microbiota in a model of human microbiota-associated rats. *PloS one*, 8(11) :e80578.
- Saint-Cyr, M. J., Perrin-Guyomard, A., Houée, P., Vasseur, M. V., and Laurentie, M. (2014). Use of accuracy profile procedure to validate a real-time pcr method to quantify bacteria in feces. *Journal of AOAC International*, 97(2) :573–579.

- Saint-Ruf, C. and Matic, I. (2006). Environmental tuning of mutation rates. *Environmental microbiology*, 8(2) :193–199.
- Salanitro, J., Blake, I., and Muirhead, P. (1977). Isolation and identification of fecal bacteria from adult swine. *Applied and environmental microbiology*, 33(1) :79–84.
- Sanders, P., Bousquet-Mélou, A., Chauvin, C., and Toutain, P.-L. (2011). Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique. *INRA Prod. Anim*, 24(2) :199–204.
- Sansom, B. and Gleed, P. (1981). The ingestion of sow’s faeces by suckling piglets. *British Journal of Nutrition*, 46(03) :451–456.
- Saraoui, T., Parayre, S., Guernec, G., Loux, V., Montfort, J., Le Cam, A., Boudry, G., Jan, G., and Falentin, H. (2013). A unique *in vivo* experimental approach reveals metabolic adaptation of the probiotic *Propionibacterium freudenreichii* to the colon environment. *BMC genomics*, 14(1) :911.
- Sattler, V., Bayer, K., Schatzmayr, G., and Klose, V. (2014). Impact of a probiotic, inulin, or their combination on the piglets’ microbiota at different intestinal locations. *Beneficial microbes*, pages 1–11.
- Schink, A.-K., Kadlec, K., and Schwarz, S. (2011). Analysis of blaCTX-M-carrying plasmids from *Escherichia coli* isolates collected in the BfT-GermVet study. *Applied and environmental microbiology*, 77(20) :7142–7146.
- Scientific Advisory Group on Antimicrobials of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use and others (2009). Reflection paper on the use of third and fourth generation cephalosporins in food producing animals in the European Union : development of resistance and impact on Human and animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32(6) :515–533.
- Sears, C. L. (2005). A dynamic partnership : celebrating our gut flora. *Anaerobe*, 11(5) :247–251.
- Seynaeve, M., De Wilde, R., Janssens, G., and De Smet, B. (1996). The influence of dietary salt level on water consumption, farrowing, and reproductive performance of lactating sows. *Journal of animal science*, 74(5) :1047–1055.
- Simpson, J. M., McCracken, V. J., White, B. A., Gaskins, H. R., and Mackie, R. I. (1999). Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *Journal of Microbiological Methods*, 36(3) :167–179.
- Šmajš, D., Bureš, J., Šmarda, J., Chaloupková, E., Květina, J., Förstl, M., Kohoutová, D., Kuneš, M., Rejchrt, S., Lesná, J., et al. (2012). Experimental administration of the probiotic *Escherichia coli* strain nissle 1917 results in decreased diversity of *E. coli* strains in pigs. *Current microbiology*, 64(3) :205–210.

- Stanton, T. B. and Humphrey, S. B. (2011). Persistence of antibiotic resistance : evaluation of a probiotic approach using antibiotic-sensitive *Megasphaera elsdenii* strains to prevent colonization of swine by antibiotic-resistant strains. *Applied and environmental microbiology*, 77(20) :7158–7166.
- Starke, I., Pieper, R., Neumann, K., Zentek, J., and Vahjen, W. (2013). Individual responses of mother sows to a probiotic *Enterococcus faecium* strain lead to different microbiota composition in their offspring. *Beneficial microbes*, 4(4) :345–356.
- Stewart, C. S. (1997). Microorganisms in hindgut fermentors. *Gastrointestinal microbiology*, 2 :142–186.
- Struve, T. (2011). Risk assessment of antimicrobial usage in Danish pig production on the human exposure to antimicrobial resistant bacteria from pork. (PhD thesis, DTU, Copenhagen, DK).
- Stück, K., Faul, K., Hylla, S., Stein, J., and Breves, G. (1995). The application of a semi-continuous colon simulation technique (Cositec) for studying the effects of clindamycin on microbial hindgut metabolism. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 33(5) :241–246.
- Swords, W., Wu, C.-C., Champlin, F., and Buddington, R. (1993). Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. *Neonatology*, 63(3) :191–200.
- Tamang, M. D., Nam, H.-M., Kim, S.-R., Chae, M. H., Jang, G.-C., Jung, S.-C., and Lim, S.-K. (2013). Prevalence and molecular characterization of CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy swine and cattle. *Foodborne pathogens and disease*, 10(1) :13–20.
- Tanner, S. A., Berner, A. Z., Rigozzi, E., Grattepanche, F., Chassard, C., and Lacroix, C. (2014a). *In vitro* continuous fermentation model (polyferms) of the swine proximal colon for simultaneous testing on the same gut microbiota. *PloS one*, 9(4) :e94123.
- Tanner, S. A., Chassard, C., Berner, A. Z., and Lacroix, C. (2014b). Synergistic effects of *Bifidobacterium thermophilum* rbl67 and selected prebiotics on inhibition of *Salmonella* colonization in the swine proximal colon polyferms model. *Gut pathogens*, 6(1) :44.
- Thanantong, N., Edwards, S., and Sparagano, O. A. (2006). Characterization of lactic acid bacteria and other gut bacteria in pigs by a macroarraying method. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081(1) :276–279.
- Thévenot, J., Etienne-Mesmin, L., Denis, S., Chalancon, S., Alric, M., Livrelli, V., and Blanquet-Diot, S. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 :H7 survival in an in vitro model of the Human large intestine and interactions with probiotic yeasts and resident microbiota. *Applied and environmental microbiology*, 79(3) :1058–1064.

- Timmerman, T., Dewulf, J., Catry, B., Feyen, B., Opsomer, G., Kruif, A. d., and Maes, D. (2006). Quantification and evaluation of antimicrobial drug use in group treatments for fattening pigs in Belgium. *Preventive veterinary medicine*, 74(4) :251–263.
- Ueda, K., Matteotti, R., Assalia, A., and Gagner, M. (2006). Comparative evaluation of gastrointestinal transit and immune response between laparoscopic and open gastrectomy in a porcine model. *Journal of gastrointestinal surgery*, 10(1) :39–45.
- Upadrasta, A., O’Sullivan, L., O’Sullivan, O., Sexton, N., Lawlor, P. G., Hill, C., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., and Ross, R. P. (2013). The effect of dietary supplementation with spent cider yeast on the swine distal gut microbiome. *PloS one*, 8(10) :e75714.
- Usui, M., Sakemi, Y., I., U., and Y., T. (2014). Effects of fluoroquinolone treatment and group housing of pigs on the selection and spread of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter*. *Veterinary Microbiology*, 170(3-4) :438–441.
- Valdovska, A., Jemeljanovs, A., Pilmane, M., Zitare, I., Konosonoka, I., and Lazdins, M. (2013). Alternative for improving gut microbiota : use of jerusalem artichoke and probiotics in diet of weaned piglets. *Polish journal of veterinary sciences*, 17(1) :61–69.
- Van den Abbeele, P., Roos, S., Eeckhaut, V., MacKenzie, D. A., Derde, M., Verstraete, W., Marzorati, M., Possemiers, S., Vanhoecke, B., Van Immerseel, F., et al. (2012). Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by *Lactobacilli*. *Microbial biotechnology*, 5(1) :106–115.
- Vandaele, E. (2014). Un été brûlant pour les antibiotiques. *Semaine Vétérinaire 1594*, pages 23–27.
- Varel, V. H., Robinson, I. M., and Jung, H. (1987). Influence of dietary fiber on xylanolytic and cellulolytic bacteria of adult pigs. *Applied and environmental microbiology*, 53(1) :22–26.
- Vieira, A. R., Pires, S. M., Houe, H., and Emborg, H.-D. (2011). Trends in slaughter pig production and antimicrobial consumption in Danish slaughter pig herds, 2002-2008. *Epidemiology and infection*, 139(10) :1601–1609.
- Vigre, H., Dohoo, I. R., Stryhn, H., and Jensen, V. F. (2010). Use of register data to assess the association between use of antimicrobials and outbreak of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Danish pig herds. *Preventive veterinary medicine*, 93(2) :98–109.
- Vrieze, A., Holleman, F., Zoetendal, E., De Vos, W., Hoekstra, J., and Nieuwdorp, M. (2010). The environment within : how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*, 53(4) :606–613.
- Wagner, R. D. (2008). Effects of microbiota on gi health : gnotobiotic research. In *GI Microbiota and Regulation of the Immune System*, pages 41–56. Springer.

- Walker, W. A. (1985). Role of the mucosal barrier in toxin/microbial attachment to the gastrointestinal tract. In *Ciba Foundation Symposium 112-Microbial Toxins and Diarrhoeal Disease*, pages 34–56. Wiley Online Library.
- Walsh, M. C., Gardiner, G. E., Hart, O. M., Lawlor, P. G., Daly, M., Lynch, B., Richert, B. T., Radcliffe, S., Giblin, L., Hill, C., et al. (2008). Predominance of a bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a five-strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype. *FEMS microbiology ecology*, 64(2) :317–327.
- Wehner, R. and Gehring, W. (1999). *Biologie et physiologie animales : bases moléculaires, cellulaires, anatomiques et fonctionnelles*. De Boeck Supérieur.
- WHO (2011). Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective. (www.euro.who.int).
- Wittum, T. E. (2012). The challenge of regulating agricultural ceftiofur use to slow the emergence of resistance to extended-spectrum cephalosporins. *Applied and environmental microbiology*, 78(22) :7819–7821.
- Wiuff, C., Lykkesfeldt, J., Svendsen, O., and Aarestrup, F. M. (2003). The effects of oral and intramuscular administration and dose escalation of enrofloxacin on the selection of quinolone resistance among *Salmonella* and coliforms in pigs. *Research in veterinary science*, 75(3) :185–193.
- Woodford, N., Fagan, E. J., and Ellington, M. J. (2006). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(1) :154–155.
- Zhang, H., Malo, C., Boyle, C. R., and Buddington, R. K. (1998). Diet influences development of the pig (*Sus scrofa*) intestine during the first 6 hours after birth. *The Journal of nutrition*, 128(8) :1302–1310.
- Zhang, H., Malo, C., and Buddington, R. K. (1997). Suckling induces rapid intestinal growth and changes in brush border digestive functions of newborn pigs. *The Journal of nutrition*, 127(3) :418–426.
- Zoetendal, E. G., Collier, C. T., Koike, S., Mackie, R. I., and Gaskins, H. R. (2004). Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota : a review. *The Journal of nutrition*, 134(2) :465–472.
- Zoetendal, E. G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A. D., and de Vos, W. M. (2002). Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and environmental microbiology*, 68(7) :3401–3407.

VU :


Le Directeur de Thèse
Isabelle KEMPF



VU :

Le Responsable de l'École Doctorale

Le co-Directeur de Thèse
Monique ALRIC



VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINEAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,
(Nom et Prénom)

Résumé

Dans le contexte de l'antibiorésistance, l'objet de ce doctorat vise à évaluer l'impact d'antibiotiques sur le microbiote intestinal de porcelets. La colistine et le ceftiofur, pour lesquels les résistances incluent essentiellement et respectivement mutations chromosomiques et gènes plasmidiques, ont été utilisés. La colistine a significativement réduit la population des entérobactéries, mais aucun *E. coli* résistant n'a été détecté. L'administration de ceftiofur a eu un impact limité sur les populations bactériennes composant l'écosystème digestif mais a conduit à une forte sélection et à la diffusion d'un gène plasmidique codant pour une bêta-lactamase à spectre étendu.

Puis, dans le cadre de la réglementation visant à diminuer l'expérimentation animale, un modèle *in vitro* colique porcin, nommé PigutIVM, a été mis au point afin de simuler l'environnement digestif du porcelet et a permis de confirmer, *in vitro*, l'effet observé *in vivo* de la colistine sur le microbiote. Cet outil a ensuite été utilisé pour évaluer l'impact d'un probiotique, *Saccharomyces cerevisiae*, comme alternative aux antibiotiques. Le modèle PigutIVM devrait se positionner comme un outil de prédiction pertinent dans les domaines d'investigation aussi bien nutritionnels que pharmacologiques.

Mots clés : Microbiote intestinal, antibiorésistance, PigutIVM modèle, porcelet.

Abstract

In the context of antibiotic resistance, the aim of the current PhD work is to assess the impact of antibiotics on intestinal microbiota of piglets. Two antibiotics *i.e.* colistin and ceftiofur, for which the main resistances include respectively chromosomal mutations and plasmid genes have been used. Colistin significantly reduced the population of *Enterobacteriaceae*, but there was no selection of resistant *E. coli*. The administration of ceftiofur had a limited impact on the bacterial populations that make up the digestive ecosystem but it led to strong selection and dissemination of a plasmid gene encoding an extended-spectrum beta-lactamase. Then, in the framework of regulations to reduce animal testing, an *in vitro* model of colonic pig named PigutIVM was developed in order to simulate the digestive environment of the piglet and then check the effect of colistin on the microbiota simulated in PigutIVM *in vitro*. Therefore both the approaches *i.e. in vivo* and *in vitro* were compared in order to check the effect of colistin on intestinal microbiota of piglets. This tool was then used to evaluate the impact of a probiotic *i.e. Saccharomyces cerevisiae*, as alternative to antibiotics. Therefore we assume that this PigutIVM model should be positioned as a relevant predictive tool in the fields of nutritional and pharmacological investigations.

Keywords : Intestinal microbiota, antimicrobial resistance, PigutIVM model, piglet.